

**Wirkung mehrfach ungesättigter Fettsäuren auf  
spannungsabhängige Kaliumkanäle**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der Friedrich Schiller-Universität Jena

von Annemarie Köhler  
geboren am 19.08.1983 in Hildburghausen

September 2011

Erster Gutachter: .....  
Zweiter Gutachter: .....  
Dritter Gutachter: .....  
Tag der öffentlichen Verteidigung: .....

## Abkürzungen

AA	Arachidonsäure
AE	Anandamid (Ethanolamin der Arachidonsäure)
AVEO118	2'-{[2-(4-Methoxy-Phenyl)-Acetylamino]-Methyl}- Biphenyl-2-Carbonsäure(2-Pyridin-3-yl-Ethyl)-amid
BSA	Bovines Serumalbumin
CoA	Coenzym A
C3/C4/C6/C8/C10-TEA	Propyl/ Butyl/ Hexyl/ Octyl/ Decyltriethylammonium
-Br	- Bromid
DMHA	Dimethylhexylamin
DMPA	Diethylmethylpropylammonium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DR-Kanal	verzögerter Gleichrichter
EGTA	Ethylenglykol-bis( $\beta$ -aminoethylether)-tetraessigsäure
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
K2P-Kanal	Zwei-Porendomänen Kaliumkanäle
KcsA-Kanal	Kaliumkanal aus Streptomyces lividans
Kv-Kanal	spannungsabhängiger Kaliumkanal
KvAP-Kanal	spannungsabhängiger Kaliumkanal aus Aeropyrum pernix
k <sub>on</sub>	„on-rate“, Bindungsrate
k <sub>off</sub>	„off-rate“, Freisetzungsrate
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPI	Lysophosphatidylinositol
NAD(P)	Nicotinamadenindinukleotid(phosphat)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
2PD-Kanäle	Kaliumkanäle mit 2 Porendomänen
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositolbisphosphat
PLA2	Phospholipase A2
Psora-4	5-(4-Phenylbutoxy)psoralen
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäure
QX314	Lidocain N-ethyl bromid
tau	Zeitkonstante der Inhibition
TEA	Tetraethylammonium-Chlorid
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WT	Wildtyp

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>6</b>
<b>Publikationen</b>	<b>9</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>10</b>
1.1 Historie der Kv-Kanäle . . . . .	11
1.2 Molekularer Aufbau der Kv-Kanäle . . . . .	12
1.3 Bedeutung von $\beta$ -Untereinheiten . . . . .	17
1.4 Inaktivierungsmechanismen an Kv-Kanälen . . . . .	18
1.4.1 „N-type“ Inaktivierung . . . . .	18
1.4.2 „C-type“ Inaktivierung . . . . .	20
1.5 (Patho)Physiologie des Shaker-, Kv2.1- und Kv3.1-Kanals . . . . .	24
1.6 Freisetzung der PUFA Arachidonsäure und ihrer Metabolite . . . . .	26
1.7 Wirkung von Arachidonsäure auf Ionenkanäle . . . . .	27
1.8 Inhibition von Kv-Kanälen durch Arachidonsäure . . . . .	29
1.9 Hypothesen zum Wirkmechanismus der PUFA-Inhibition in Kv-Kanälen	31
1.9.1 PUFA induzieren eine Konformationsänderung im Selektivitäts- filter . . . . .	31
1.9.2 PUFA binden als „open-channel“ Blocker in der Pore . . . . .	33
<b>2 Ziele der Arbeit</b>	<b>37</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>38</b>
3.1 Oocytenpräparation und Injektion mit cRNA . . . . .	38
3.2 Elektrophysiologische Untersuchungen mittels der „voltage-clamp“ Me- thode . . . . .	39
3.3 Rezepte verwendeter Lösungen und Chemikalien . . . . .	41

3.4	Datenaufnahme und Datenauswertung . . . . .	42
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>43</b>
4.1	Empfindlichkeitsunterschiede der PUFA-Inhibition in Kv-Kanälen . . .	43
4.2	PUFA wirken von der intrazellulären Seite der Zellmembran . . . . .	45
4.3	Beobachtung des „foot in the door“ Phänomens bei PUFA-Inhibition von Kv-Kanälen . . . . .	47
4.4	Wirkung von TEA und seiner Derivate auf Kv-Kanäle . . . . .	48
4.4.1	Abschwächung der PUFA-Inhibition durch intrazelluläres TEA .	48
4.4.2	Wirkung der TEA-Derivate auf die PUFA-Inhibition . . . . .	51
4.4.3	Mutation T441S am Shaker-Kanal hebt die Wirkung von intra- zellulärem TEA auf die PUFA-Inaktivierung auf . . . . .	57
4.5	Wirkung von Rubidiumionen auf die Inhibition von Kv-Kanälen durch Arachidonsäure und „klassischen“ „open-channel“ Blockern . . . . .	58
4.5.1	Beteiligung des Selektivitätsfilters an der PUFA-Inaktivierung .	61
4.5.2	Rubidiumtitration der PUFA-Inaktivierung . . . . .	62
4.6	Vergleich der PUFA- und „C-type“ Inaktivierung . . . . .	65
4.6.1	Extrazelluläre Kaliumionen und TEA haben keinen Einfluss auf die PUFA-Inaktivierung . . . . .	65
4.6.2	Mutation T449Y/V am Shaker-Kanal hat keinen Einfluss auf die PUFA-Inaktivierung . . . . .	68
4.7	Vielzahl von hydrophoben Substanzen induzieren eine rubidiumabhän- gige Inaktivierung . . . . .	69
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>73</b>
5.1	Neues Konzept des Wirkmechanismus der PUFA-Inaktivierung . . . . .	73
5.2	Vergleich „C-type“ Inaktivierung und PUFA-Inaktivierung . . . . .	76
<b>6</b>	<b>Schlussfolgerung</b>	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis</b>	<b>80</b>
	<b>Anhang</b>	<b>92</b>

# Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden elektrophysiologische Experimente an spannungsabhängigen Kaliumkanälen (Kv-Kanäle) mittels der „patch-clamp“ Technik durchgeführt, um den Wirkmechanismus mehrfach ungesättigter Fettsäuren (PUFA- polyunsaturated fatty acid) zu untersuchen. Die generelle Aufgabe von Kv-Kanälen besteht darin, das Ruhemembranpotential durch die Leitung von Kaliumionen von intra- nach extrazellulär nach einer Membrandepolarisation wieder herzustellen. Stellvertretend für die Familie der Kv-Kanäle wurden experimentelle Untersuchungen am Shaker IR ( $\Delta 6-46$ )-, Kv2.1- und Kv3.1-Kanal durchgeführt. Während der Shaker-Kanal in der Fruchtfliege „*Drosophila melanogaster*“ exprimiert wird, sind der Kv2.1- und Kv3.1-Kanal u.a. in Neuronen, im Pankreas, in Kardiomyozyten oder in den glatten Gefäßmuskelzellen des Menschen zu finden.

Den 12 Subfamilien der Kv-Kanäle gemein ist deren molekularer Aufbau bestehend aus vier gleichen  $\alpha$ -Untereinheiten, wobei sich jede aus sechs Transmembrandomänen (S1-S6) und dem intrazellulärem N- bzw. C-Terminus zusammensetzt. Dabei bilden die Transmembransegmente S1-S4 die Spannungssensordomäne und S5 und S6 mit dazwischenliegender „P-Schleife“ die Porendomäne einer  $\alpha$ -Untereinheit.

Nach Öffnung durch Membrandepolarisation zeigen viele Kv-Kanäle eine starke Abnahme der Aktivität. Dieses Verhalten wird als Inaktivierung bezeichnet und beeinflusst maßgeblich die Dauer und Frequenz von Aktionspotentialen in z.B. Neuronen und Muskelzellen. Gegenwärtig werden zwei Inaktivierungsmechanismen unterschieden: „N-type“- und „C-type“ Inaktivierung. Bei der „N-type“- oder auch „ball-and-chain“ Inaktivierung handelt es sich um einen sehr schnellen Inaktivierungsmechanismus. Dabei dringen Polypeptidketten des N-Terminus (sogenannte Inaktivierungsdomänen) ähnlich einem „open-channel“ Blocker in die Pore ein und verschließen diese. Im Rah-

men der langsamer ablaufenden „C-type“ Inaktivierung kommt es zu Konformationsänderungen im Bereich der äußeren Pore und des Selektivitätsfilters, was einen Verlust der Ionenleitfähigkeit (Porenkollaps) zur Folge hat.

Ein weiterer erst seit einigen Jahren bekannter Inhibitionsmechanismus, welcher der „N-type“ Inaktivierung ähnelt, ist die Inhibition durch PUFA (u.a. Arachidonsäure und Anandamid). Der molekulare Mechanismus der PUFA-Inhibition ist derzeit nicht abschließend geklärt und Gegenstand dieser Arbeit. Eine Vielzahl von Faktoren u.a. die Aktivierung der Phospholipase A2 (PLA2) im Rahmen von Rezeptorstimulation oder Entzündungsprozessen führen zur Freisetzung von Arachidonsäure. Die Inhibition von Kv-Kanälen durch PUFA wie z.B. Arachidonsäure ist von potentiell großer physiologischer- und pathophysiologischer Relevanz, weil dadurch u.a. das Frequenzverhalten von z.B. Neuronen moduliert werden würde.

In zwei erst kürzlich veröffentlichten Arbeiten (Decher et al., 2010; Moreno-Galindo et al., 2010) wurde das Konzept einer „open-channel“ Blockade durch PUFA postuliert. Dabei sollen intrazelluläre PUFA in der Pore von Kv-Kanälen binden und diese dadurch verschließen. Oliver et al. postulierten hingegen, dass PUFA über einen allosterischen Mechanismus eine Konformationsänderung am Selektivitätsfilter induzieren und ähnlich der „C-type“ Inaktivierung zu einem Porenkollaps führen (Oliver et al., 2004).

Die Ergebnisse meiner Arbeit implizieren, dass der Wirkmechanismus der Inhibition von Kv-Kanälen durch PUFA eine Kombination beider postulierten Mechanismen darstellt. So ist es wahrscheinlich, dass PUFA in der Pore binden und mit den Aminosäuren der S6-Segmente interagieren. Das Binden in der Pore führt aber vermutlich nicht zur Blockade der Pore sondern induziert über einen allosterischen Mechanismus eine Konformationsänderung im Bereich des Selektivitätsfilters, was zum Verlust der Kaliumleitfähigkeit führt (Porenkollaps).

Dieser Porenkollaps am Selektivitätsfilter unterscheidet sich jedoch von der „klassischen“ „C-type“ Inaktivierung. Meine Ergebnisse zeigen, dass Punktmutationen, welche die „C-type“ Inaktivierung beeinflussen keine Wirkung auf die PUFA-induzierte Inaktivierung haben.

Im letzten Teil meiner Arbeit sind verschiedene endogene hydrophobe Substanzen u.a. Lysophospholipide, welche als Hydrolyseprodukt der Phospholipase A2 neben der

Arachidonsäure entstehen, untersucht worden. Alle untersuchten Substanzen führen, ähnlich der Arachidonsäure, zu einer Inaktivierung von Kv-Kanälen. Die Ergebnisse zeigen, dass strukturell verschiedene hydrophobe Substanzen in der Pore von Kv-Kanälen binden und eine Inaktivierung am Selektivitätsfilter auslösen.

Dieser Wirkmechanismus, dass bestimmte hydrophobe Substanzen durch Bindung an Kv-Kanälen einen allosterischen Inaktivierungsmechanismus auslösen, ist neuartig und sollte für andere hydrophobe Verbindungen u.a. für Medikamente weiter untersucht werden.



# Publikationen

Decher N, Streit AK, Rapedius M, Netter MF, Marzian S, Ehling P, Schlichthörl G, Craan T, Renigunta V, Köhler A, Dodel RC, Navarro-Polanco RA, Preisig-Müller R, Klebe G, Budde T, Baukrowitz T, Daut J. 2010. RNA editing modulates the binding of drugs and highly unsaturated fatty acids to the open pore of Kv potassium channels. EMBO J, [Epub ahead of print]. In diese Arbeit sind im Wesentlichen Daten zur Konkurrenz von Tetraethylammonium mit PUFA eingegangen.

Köhler A. 2011. The mechanism of inhibition of voltage gated potassium channels of polyunsaturated fatty acids - open-channel block versus selectivity filter inactivation. (manuscript in preparation).

# 1 Einleitung

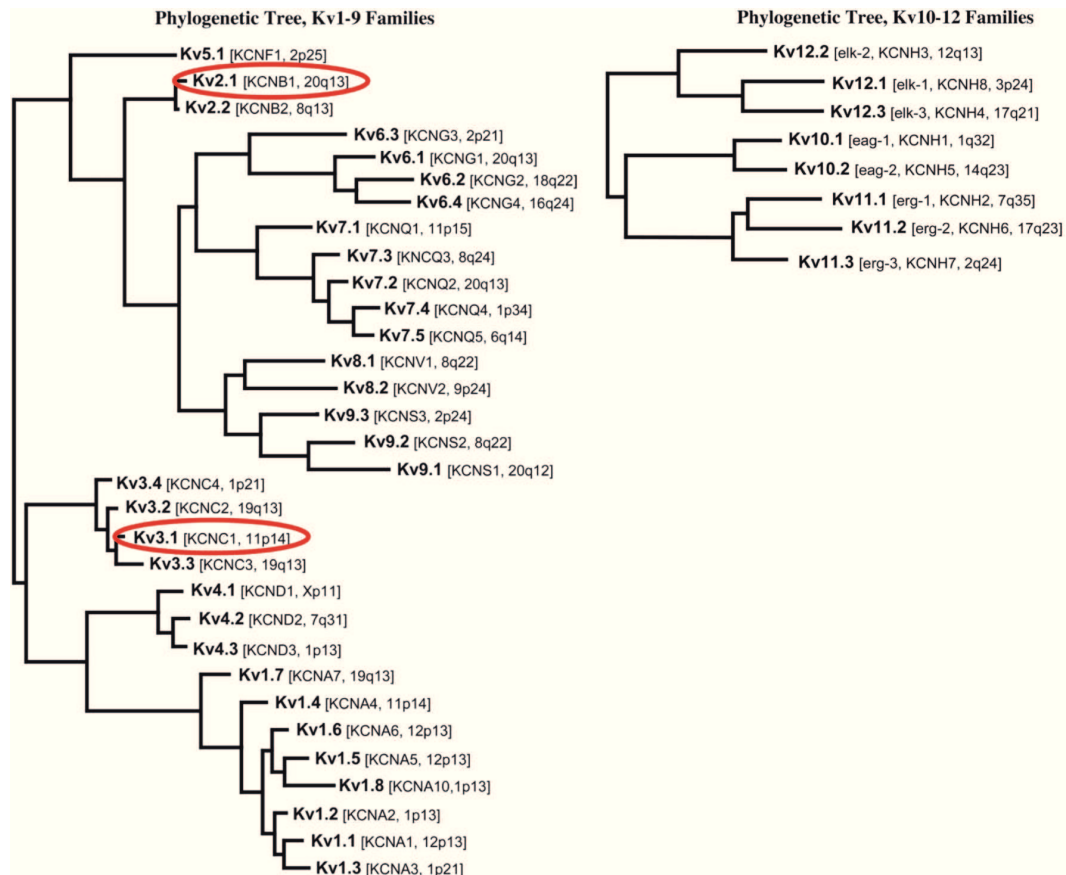
Kaliumkanäle sind eine sehr alte Proteinfamilie, die sowohl in prokaryontischen als auch eukaryontischen Zellen exprimiert und phylogenetisch von einer gemeinsamen Urform abstammen (Derst and Karschin, 1998). Für Kaliumkanäle kodierende Gensequenzen können in fast allen Organismen wie z.B. Bakterien, Pilzen, Pflanzen, Intervertebraten und Vertebraten nachgewiesen werden (Jan and Jan, 1997). Nach Sequenzierung des menschlichen Genoms wurden initial 67 Kaliumkanalgene beschrieben (Venter et al., 2001). Aus einer DNA-Sequenz können zudem durch alternatives Spleißen verschiedene mRNA-Transkripte generiert oder die Proteine posttranslational modifiziert werden. Auch die Assoziation der Kv-Kanäle mit akzessorischen Proteinen wie  $\beta$ -Untereinheiten (Robertson, 1997) ist möglich. Im Weiteren können durch Zusammenlagerung verschiedener  $\alpha$ -Untereinheiten in der Regel einer Subfamilie (Covarrubias et al., 1991; Salkoff et al., 1992) Heterotetramere entstehen (Christie et al., 1990; Isacoff et al., 1990; Ruppersberg et al., 1990). Damit stellt die Familie der Kaliumkanäle die größte und vielfältigste Gruppe aller Ionenkanäle dar (Coetzee et al., 1999). Kaliumkanäle werden sowohl in erregbaren als auch in nicht erregbaren Zellen exprimiert und sind an vielen Signaltransduktionsprozessen im menschlichen Organismus beteiligt. Dazu gehören u.a. die Regulation der Herzfrequenz, des Tonus glatter Muskelzellen, der Insulinsekretion und der neuronalen Erregbarkeit, sowie die Steuerung der Hormon- bzw. Transmittersekretion, die Aufrechterhaltung der Kaliumhomöostase und die Osmoregulation (Shieh et al., 2000).

## 1.1 Historie der Kv-Kanäle

In dieser Arbeit sollen im speziellen die spannungsabhängigen Kaliumkanäle (Kv-Kanäle), Shaker IR ( $\Delta 6-46$ )-, Kv2.1- und Kv3.1-Kanal untersucht werden. Entdeckt wurden die Kv-Kanäle bereits im Jahr 1936 im Riesenaxon des Tintenfisches *Loligo* (Hodgkin et al., 1952). Erst viele Jahre später im Jahr 1987 gelang es zum ersten Mal eine Gensequenz der Fruchtfliege „*Drosophila melanogaster*“ zu klonieren, welche für einen spannungsempfindlichen Kaliumkanal kodierte (genannt „A-Kanal“) (Kamb et al., 1987; Papazian et al., 1987). Das für den Shaker-Kanal kodierende „Sh-Gen“ war entdeckt. Analog zur Homologie dieser Kanaluntereinheit wurden drei weitere Kv-Kanäle im Genom der Fruchtfliege *Drosophila* identifiziert (Butler et al., 1989, 1990; Wei et al., 1990; Covarrubias et al., 1991). Dabei handelte es sich um das „Shab-, Shaw- und Shal-Gen“, welche für die nach standardisierter Nomenklatur benannten Kv2-, Kv3- und Kv4-Kanäle kodieren (Chandy, 1991; Chandy and Gutman, 1995). Kv-Kanäle aus Säugetieren (wie Mäusen und Menschen) konnten erstmalig durch Salkoff et al. im Jahr 1992 kloniert werden.

## 1.2 Molekularer Aufbau der Kv-Kanäle

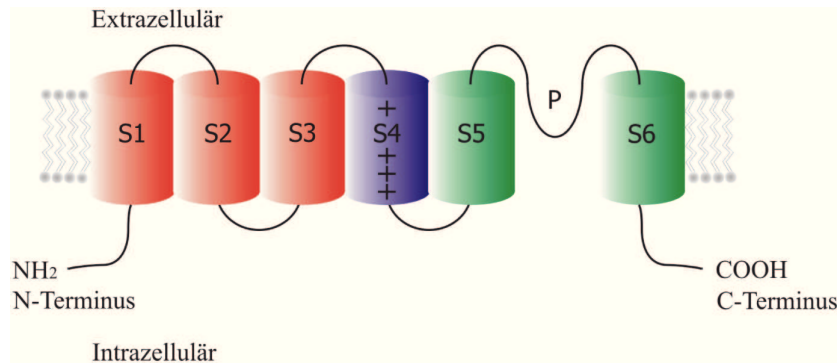
Heute sind insgesamt 12 Subfamilien der Kv-Kanäle (Kv1.x-Kv12.x) bekannt (Abb.1.1) (Gutman et al., 2005). Die Zuordnung eines Kv-Kanals zu einer Subfamilie erfolgte bei phylogenetischer Übereinstimmung der Proteinsequenz von ca. 65%.



**Abbildung 1.1: Phylogenetischer Baum der Kv-Kanäle nach Gutman et al., 2005.** Links Kv1- Kv9 Familien und Rechts Kv10- Kv12 Familien, ergänzend die KCN-Nomenklatur der „Human Genome Organisation“ (HUGO) (White et al., 1997) und die Lokalisation auf dem Chromosom.

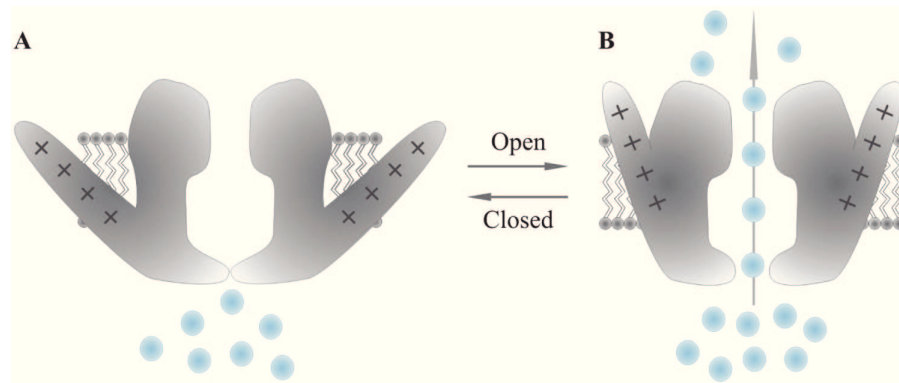
Allen Kv-Kanälen gemein ist ihr molekularer Aufbau aus vier meist gleichen  $\alpha$ -Untereinheiten. Jede  $\alpha$ -Untereinheit besteht aus sechs Transmembrandomänen (S1-S6) (Jan and Jan, 1992; Pongs, 1992; Chandy and Gutman, 1995), dem intrazellulären N- bzw. C-Terminus und der extrazellulären P-Schleife. Insgesamt setzt sich ein funktionsfähiger Kv-Kanal aus vier  $\alpha$ -Untereinheiten, welche eine membranintegrierte Pore bilden, zusammen.

Die Transmembransegmente S1-S4 bilden die Spannungssensordomäne einer  $\alpha$ -Untereinheit, wobei das S4-Segment den eigentlichen Spannungssensor darstellt und an jeder dritten Stelle der Aminosäuresequenz positiv geladene Arginin- oder Lysinreste aufweist (Catterall, 1988; Liman et al., 1991; Papazian et al., 1991) (Abb.1.2).



**Abbildung 1.2: Aufbau einer  $\alpha$ -Untereinheit eines Kv-Kanals (schematisch), bestehend aus sechs Transmembrandomänen (S1-S6) und einem N- und C-Terminus. Als Spannungssensor dient das S4-Segment. Die Pore mit Selektivitätsfilter wird durch das S5- und S6 Segment gebildet.**

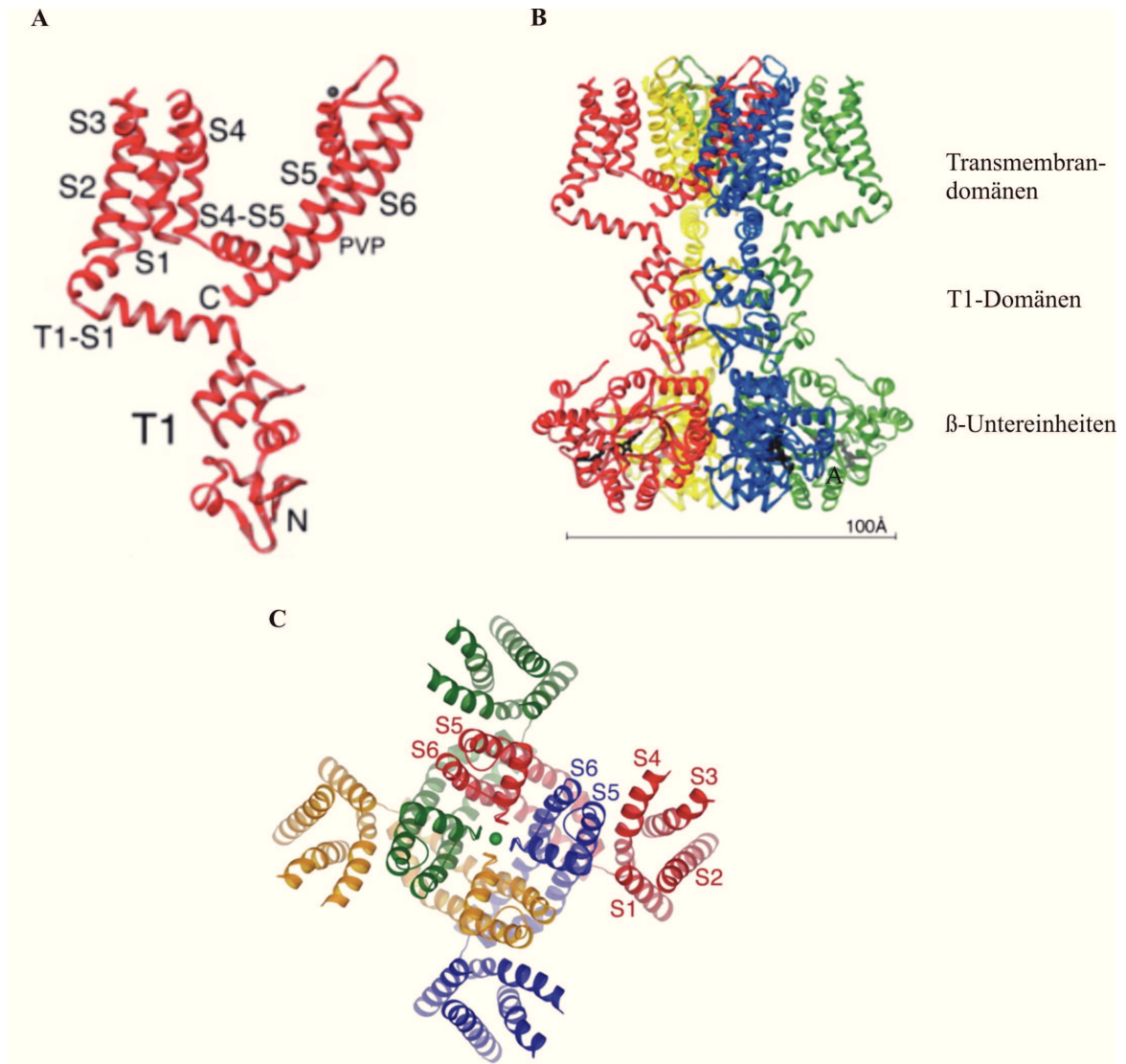
Der Aktivierungsprozess wurde in zahlreichen Publikationen diskutiert und anhand verschiedener Modelle u.a. dem „helical screw“- (Durell et al., 2004; Shrivastava et al., 2004), „gating pore“- (Yang et al., 1996), „transporter“- (Starace and Bezanilla, 2004) und dem „paddle“-Modell interpretiert. Das „paddle“-Modell wurde nach Etablierung der Kristallstruktur am KvAP-Kanal des *Aeropyrum pernix*, einem Einzeller, welcher der Archaea angehört (Jiang et al., 2003a,b) und etwas später am eukaryontischen Kv1.2( $\beta_2$ )-Kanal (Long et al., 2005a,b) (Abb.1.4A-C) beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass das antiparallel zueinander stehende S3- und S4-Segment („voltage-sensor paddle“) eine funktionelle Einheit bilden, welche im geschlossenen Zustand nah an der intrazellulären Seite lokalisiert ist. Während des Aktivierungsprozesses macht das „voltage-sensor paddle“ eine große Aufwärtsbewegung durch und steht dann fast parallel zur Porenachse (Abb.1.3). Dies führt zur Umlagerung von Segment 5 und 6 und damit zur Öffnung des intrazellulären Poreneingangs.



**Abbildung 1.3: „Voltage-sensor paddle“-Modell (schematisch).**

**A** Kv-Kanal im geschlossenen Zustand. **B** Bei einer Depolarisation macht das S3-S4-Segment („paddle“) eine große Aufwärtsbewegung und induziert die Öffnung des intrazellulären Poreneingangs, wodurch die Leitung von Kaliumionen (blau) von intra- nach extrazellulär ermöglicht wird.

Die Verbindung zwischen Spannungssensor und Pore ist durch eine amphipathische  $\alpha$ -Helix, dem „S4-S5 linker“ gewährleistet, welcher parallel zur intrazellulären Membranseite ausgerichtet ist. Um die spannungsinduzierte Bewegung des S3-S4-Segmentes auf das S6-Segment zu übertragen und die Pore zu öffnen, interagiert der „S4-S5 linker“ mit dem C-terminalen Ende des S6-Segmentes unterhalb der Pro-X-Pro-Sequenz („activation-gate“), wobei „X“ eine beliebige Aminosäure sein kann (Long et al., 2005b) (Abb.1.4A). Die Pro-X-Pro-Sequenz wird in zahlreichen Kv-Kanälen exprimiert und gewährleistet korrekte Interaktionen zwischen dem Spannungssensor und der Pore.



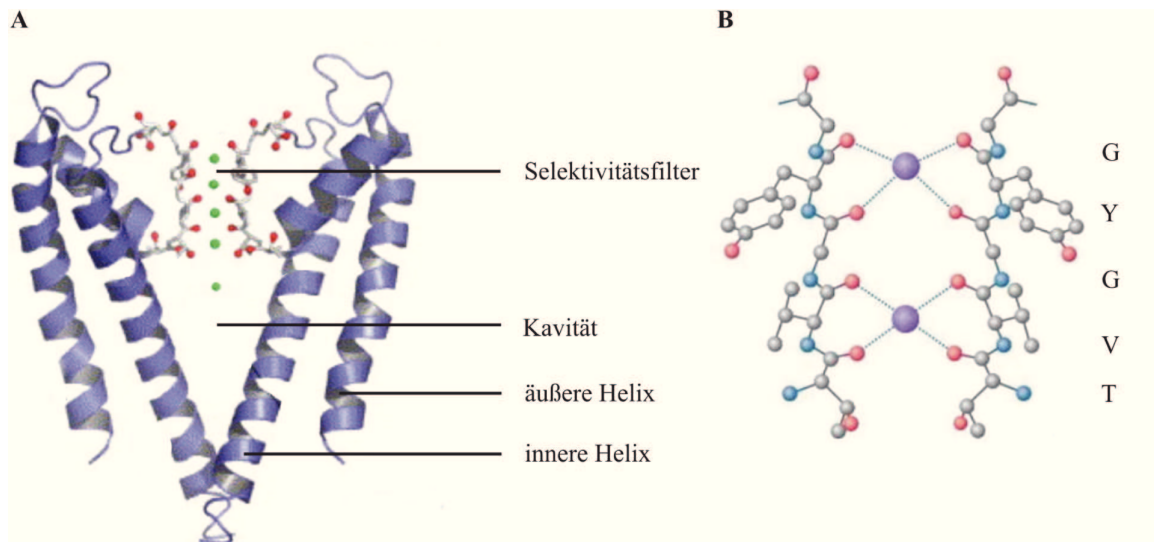
**Abbildung 1.4: Kristallstruktur des Kv1.2( $\beta$ 2)-Kanals.**

**A** Bänderdarstellung einer  $\beta$ -Untereinheit in Seitenansicht bestehend aus sechs Transmembransegmenten (S1-S6), dem „S1-T1 linker“ (siehe Abschnitt 1.3/1.4.1), dem „S4-S5 linker“, welcher die Spannungssensordomäne mit der Porendomäne verbindet, der Prolin-X-Prolin Sequenz im S6-Segment und dem C- und N-Terminus. **B** Bänderdarstellung des Kv1.2( $\beta$ 2)-Kanals in Seitenansicht. Die vier  $\alpha$ -Untereinheiten sind in unterschiedlichen Farben dargestellt. Zusätzlich ist jede T1-Domäne mit einer  $\beta$ -Untereinheit (siehe Abschnitt 1.3/1.4.1) assoziiert. **C** Aufsicht von der extrazellulären Seite (verändert nach Long et al., 2005).

Die Porendomäne, an deren Bildung jede  $\alpha$ -Untereinheit des Tetramers durch die Transmembranhelices S5- und S6 und der dazwischen liegenden „P-Schleife“ beteiligt ist (Yellen, 2002), enthält hochkonservierte Aminosäuresequenzen (TVGYG), welche für die hohe Kaliumselektivität in Kv-Kanälen verantwortlich sind (Selektivitätsfilter). Diese Sequenz ist vermutlich bei Eu- und Prokaryonten gleich (Long et al., 2005a). Demzufolge kann der Aufbau der Pore auch am bakteriellen Kaliumkanal KcsA (Doyle et al., 1998) erklärt werden (Abb.1.5A). Die Porenstruktur des KcsA-Kanals wird durch die inneren Helices der vier Kanaluntereinheiten gebildet. Dabei erinnert die Form an einen umgekehrten Kegel mit dem Selektivitätsfilter an der breiten Basis. Der Selektivitätsfilter weist insgesamt vier Bindungsstellen für Kaliumionen auf, wobei gleichzeitig immer nur zwei Bindungsstellen besetzt sind. Daraus ergeben sich folgende Konfigurationen: Kaliumion-Wasser-Kaliumion-Wasser (1-3 Konfiguration) (Abb.1.5B) und Wasser-Kaliumion-Wasser-Kaliumion (2-4 Konfiguration) (Zhou and MacKinnon, 2003). Die relative Verteilung wird durch die Karbonylsauerstoffe der Aminosäuren TVGYG bestimmt, welche die Hydrathülle der Kaliumionen durch Ausbildung einer Ringstruktur ersetzen. Damit ist die Grundlage für die hohe Selektivität gelegt, welche die Kv-Kanäle befähigt Kaliumionen passieren zu lassen und Natrium- oder Lithiumionen mit kleineren Atomradien nicht.

Ein großer mit Wasser gefüllter Bereich, die Kavität, befindet sich im Zentrum des Kanals. Sie reicht extrazellulär bis zum Selektivitätsfilter und intrazellulär bis zum „activation-gate“ im Bereich des terminalen S6-Segmentes nahe der PXP-Sequenz.





**Abbildung 1.5: Kristallstruktur KcsA-Kanal.**

**A** Zur besseren Übersicht sind nur zwei der vier  $\alpha$ -Untereinheiten des bakteriellen Kaliumkanals abgebildet. In Blau sind die äußere und innere Helix und in Grau/Rot die Aminosäuren der Porenregion und des Selektivitätsfilters (TVGYG) dargestellt (verändert nach Doyle et al., 1998). Die vier Bindungsstellen für Kaliumionen sind gleichzeitig immer nur in der **B** 1-3- oder 2-4-Konfiguration besetzt. Die relative Verteilung wird dabei durch Interaktionen der Kaliumionen mit den Karbonylsauerstoffen der Aminosäuren TVGYG bestimmt (verändert nach Schmidt und Lang, 2007).

### 1.3 Bedeutung von $\beta$ -Untereinheiten

Kv-Kanäle sind oftmals mit cytoplasmatischen oder membranständigen regulatorischen  $\beta$ -Untereinheiten (Kv $\beta$ 1 und Kv $\beta$ 2) assoziiert (Isom et al., 1994; Catterall, 1995; Yellen, 2002; Hanlon and Wallace, 2002), welche vermutlich für jede Subfamilie separat existieren.  $\beta$ -Untereinheiten sind zytoplasmatische Proteine, die eine hohe Sequenzhomologie zu Enzymen der Familie der NAD(P)H-abhängigen Oxidoreduktasen aufweisen (McCormack and McCormack, 1994). Kv $\beta$ 1 und Kv $\beta$ 2 agieren mit einer hochkonservierten Aminosäuresequenz am Aminoterminus, der T1-Domäne (Yu et al., 1996; Sewing et al., 1996; Gulbis et al., 2000), welche über einen „S1-T1 linker“ mit der S1-Domäne in Verbindung steht (Tempel et al., 1987; Kamb et al., 1987; Pongs et al., 1988; Kreusch et al., 1998) und für die Tetramerisierung der Kv1  $\alpha$ -Untereinheiten

zuständig ist. Anhand der Kristallstruktur des Kv1.2-Kanals in Abbildung 1.4B mit assoziierter  $\beta$ 2-Untereinheit lassen sich die geschilderten strukturellen Beziehungen zwischen T1-Domäne und  $\beta$ -Untereinheit gut nachvollziehen (Long et al., 2005a). Die Bindung einer  $\beta$ -Untereinheit an eine  $\alpha$ -Untereinheit zieht verschiedene funktionelle Beeinflussungen des Kv-Kanals nach sich. So kann beispielsweise bei Koexpression einer Kv $\beta$ 1-Untereinheit ein Kv-Kanal vom „Delayed-Rectifier“ (DR)- Typ (verzögerter Gleichrichter) zu einem schnell inaktivierenden A-Typ Kanal konvertiert werden, da die  $\beta$ 1-Untereinheit eine „ball-and-chain“ Inaktivierungsdomäne besitzt (siehe Abschnitt 1.4.1). Weitere Beobachtungen ergaben, dass sie die spannungsabhängige Aktivierung der Kv-Kanäle verändern (Shi et al., 1996) und die Expression der  $\alpha$ -Untereinheit in der Zellmembran erhöhen (Heinemann et al., 1996).

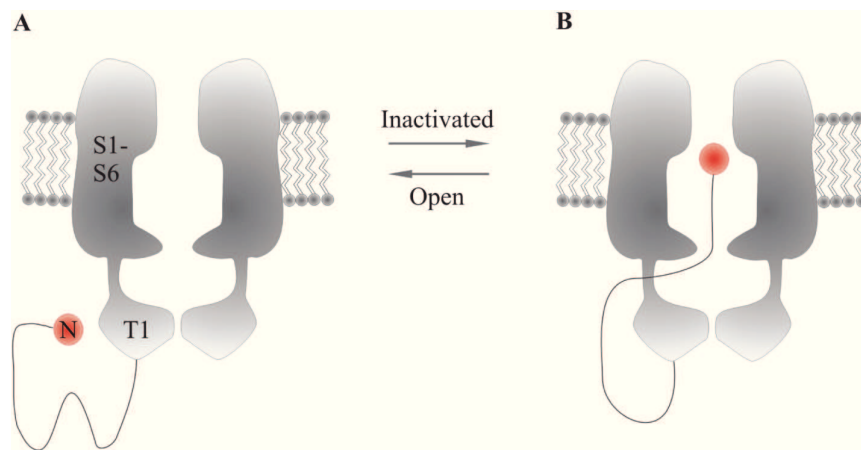
## 1.4 Inaktivierungsmechanismen an Kv-Kanälen

### 1.4.1 „N-type“ Inaktivierung

Die „N-type“ Inaktivierung ist ein schneller Inaktivierungsmechanismus, wobei ungefähr 10 hydrophobe Aminosäuren (Murrell-Lagnado and Aldrich, 1993a,b) des N-Terminus von intrazellulär in die Pore eines geöffneten Kv-Kanals eindringen, die Ionenpermeation unterbrechen und den Kv-Kanal somit inaktivieren. In die Literatur ist dieser Inaktivierungsmechanismus als „ball-and-chain“ Mechanismus eingegangen. Die „N-type“ Inaktivierung ist bisher bei den Shaker-Kanälen und u.a. dem Kv1.4- und Kv3.4-Kanal (Hoshi et al., 1990; Zagotta et al., 1990; Rasmusson et al., 1998; Beck et al., 1998) beschrieben. Im Weiteren ist erwähnenswert, dass u.a. die Kv1-Kanäle nach Assoziation mit einer  $\beta$ -Untereinheit „N-type“ Inaktivierung zeigen (Morales et al., 1995; Sewing et al., 1996; Accili et al., 1997).

Anhand der Kristallstruktur des Kv1.2- $\beta$ 2-Kanals gelang es Long et al. ein hypothetisches Model der „N-type“ Inaktivierung zu erstellen. Es konnte bestätigt werden, dass die T1-Domäne (Tempel et al., 1987; Kamb et al., 1987; Pongs et al., 1988; Kreusch et al., 1998) große Seitenportale unterhalb des Poreneingangs ausbilden. Sie gewährleisten die Tetramerisierung der  $\alpha$ -Untereinheiten, die Kommunikation zwischen Pore und Zytoplasma und ermöglichen die Blockade des Poreneingangs durch Polypeptidketten

des N-Terminus (Abb.1.6). Hierbei wird angenommen, dass die positiven Aminosäuren des N-Terminus mit den negativ geladenen Aminosäuren der T1-Domäne interagieren und die hydrophoben Aminosäuren des N-Terminus (Inaktivierungsdomäne) in die Pore eindringen und verschließen (Long et al., 2005). Die entstehenden elektrostatischen Interaktionen zwischen den geladenen Aminosäuren erhöhen dabei die Konzentration der Inaktivierungsdomäne lokal und fördern somit den Inaktivierungsprozess (Aldrich, 2001).



**Abbildung 1.6: „N-type“ Inaktivierung (schematisch).**

**A** Kv-Kanal im geöffneten Zustand. **B** Die Inaktivierungsdomäne (Aminosäuren des N-Terminus), in Rot dargestellt, dringt über die T1-Domänen, welche als Seitenportale fungieren, in die Pore ein und inaktiviert den geöffneten Kv-Kanal.

Der Mechanismus der „N-type“ Inaktivierung geht gänzlich verloren, wenn der N-Terminus des Kv-Kanals zerstört oder durch enzymatischen Abbau funktionsunfähig wird. Umgekehrt kann dieser jedoch durch nachfolgende Applikation von exogenen Peptiden, welche entsprechend der Aminosäuresequenz des N-Terminus gewählt werden, wiederhergestellt werden (Antz et al., 1999; Zagotta et al., 1990; Murrell-Lagnado and Aldrich, 1993a,b).

Ein weiterer der „N-type“ Inaktivierung kinetisch ähnelnder Inhibitionsmechanismus ist die „open-channel“ Blockade von Kv-Kanälen durch u.a. TEA (Tetraethylammonium) (Abb.1.8A) und seiner Derivate (Choi et al., 1993). Das TEA bindet am geöffneten Kv-Kanal im Bereich der intrazellulären Pore und führt daher rasch zur Blockade des

Kv-Kanals und damit zu einem Verlust der Leitfähigkeit für Kaliumionen. Interessanterweise verlangsamen intrazellulär applizierte „open-channel“ Blocker besonders das TEA die „N-type“ Inaktivierung (Choi et al., 1991). Dies impliziert eine Konkurrenz der Inaktivierungsdomäne des N-Terminus mit dem TEA um eine identische bzw. überlappende Bindungsstelle im Poreneingang (Zhou et al., 2001).

Die Anreicherung der Lipidmembran mit anionischen Phospholipiden (z.B.  $\text{PIP}_2$ ) in physiologischen Konzentrationen kann die „N-type“ Inaktivierung ebenfalls verhindern. Dieses Phänomen zeigte Oliver et al. 2004 am Kv1.4- und Kv1.1 $\beta$ -Kanal, wobei ein schnell inaktivierender Kv-Kanal vom A-Typ durch die Applikation von  $\text{PIP}_2$  zu einem „klassischen“ DR-Kanal konvertiert wird. Der zugrunde liegende Mechanismus besteht in der Sequestrierung der Inaktivierungsdomäne des N-Terminus vermutlich durch elektrostatische Interaktionen mit  $\text{PIP}_2$ .

### 1.4.2 „C-type“ Inaktivierung

Ein weiterer wichtiger Inaktivierungsprozess, welcher im Vergleich zur „N-type“ Inaktivierung deutlich langsamer abläuft, ist die „C-type“ Inaktivierung. Dieser verbleibt nach Elimination der N-terminalen Inaktivierungsdomäne (Hoshi et al., 1990) und ist abhängig von den C-terminalen Spleißvarianten (Hoshi et al., 1991).

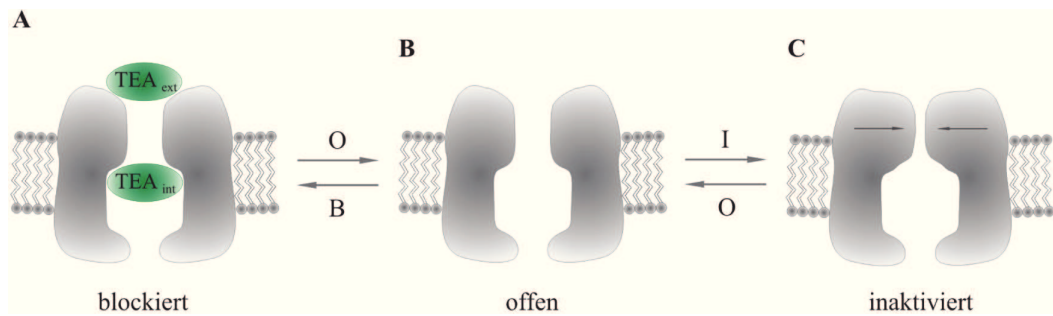
Nach heutigem Wissensstand geht man davon aus, dass es im Rahmen der „C-type“ Inaktivierung vor allem am Shaker-Kanal zu Konformationsänderungen am Selektivitätsfilter und im äußeren Bereich der Pore kommt, was einen Porenkollaps und damit u.a. einen Verlust der Kaliumleitfähigkeit zur Folge hat (Abb.1.7C). Diese Hypothese fußt auf der Beobachtung, dass Punktmutationen an der Stelle T449 im Bereich der extrazellulären Porenregion des Shaker-Kanals die Kinetik der „C-type“ Inaktivierung (López-Barneo et al., 1993) verändern. Das Einführen der Aminosäure Arginin, Lysin, Glutamat oder Alanin anstelle des Threonin beschleunigt die Inaktivierungsrate. Valin oder Tyrosin verhindern die „C-type“ Inaktivierung im Gegensatz nahezu vollständig.

Im Weiteren ist zu bemerken, dass die „C-type“ Inaktivierung durch hohe Konzentrationen extrazellulärer Kaliumionen verhindert werden kann (Hoshi et al., 1990; López-Barneo et al., 1993). Es wird vermutet, dass die Kaliumionen den Selektivitätsfilter

durch das Besetztthalten von selektiven Kaliumbindungsstellen in der Pore stabilisieren und so offen halten können. Auch extrazelluläres Tetraethylammonium (TEA), ein „klassischer“ „open channel“ Blocker der Kv-Kanäle, verhindert die „C-type“ Inaktivierung (Grissmer und Cahalan, 1989; Molina et al., 1997; Choi et al., 1991) (Abb.1.7A). Hierbei wird angenommen, dass das TEA den extrazellulären Poreneingang stabilisiert. Diese Beobachtungen sind in die Literatur unter dem Begriff „foot in the door“ Mechanismus eingegangen (Rasmusson et al., 1998).

Auf die Wirkung intrazellulären TEAs und seiner Derivate auf die „C-type“ Inaktivierung des Shaker-Kanals soll etwas ausführlicher eingegangen werden, weil sie für die Charakterisierung des PUFA-Inhibitionsmechanismus in den folgenden Abschnitten wichtig ist. Baukrowitz und Yellen konnten zeigen, dass intrazellulär appliziertes TEA die „C-type“ Inaktivierung allosterisch stark verlangsamt (Baukrowitz and Yellen, 1996).

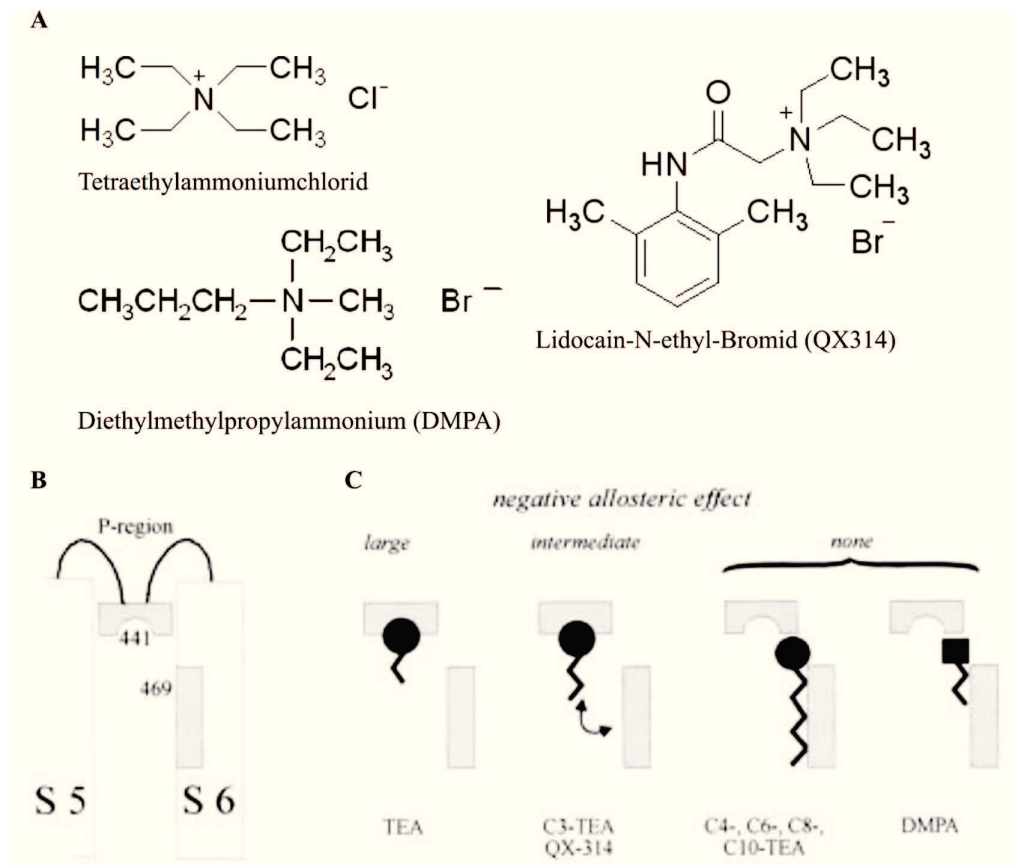
Um die „C-type“ Inaktivierung zu verlangsamen, ist die Interaktion von intrazellulärem TEA mit der Aminosäure T441 im Bereich der P-Schleife des Shaker-Kanals (Abb.1.8B+C) (Choi et al., 1993) bedeutsam. Mutationen von T441 heben die Wirkung von intrazellulärem TEA auf die „C-type“ Inaktivierung auf. Dies impliziert, dass die Interaktion von TEA mit dem intrazellulären Eingang vom Selektivitätsfilter den Porenkollaps verhindert. In anderen Worten intra- und extrazelluläres TEA scheinen den Selektivitätsfilter in seiner intakten Struktur zu stabilisieren und dadurch die „C-type“ Inaktivierung zu verlangsamen.



**Abbildung 1.7: Kv-Kanal,**

**A** im blockierten Zustand durch intra- bzw. extrazelluläres TEA (**B**), **B** geöffneten Zustand (**O**) und **C** „C-type“ inaktivierten Zustand (**I**). Diese Abbildung soll illustrieren, dass sowohl intra- als auch extrazelluläres TEA die „C-type“ Inaktivierung durch Stabilisierung der Pore an Kv-Kanälen verhindert.

Um zu untersuchen, welche strukturellen Eigenschaften eine Substanz aufweisen muss, um die „C-type“ Inaktivierung zu verlangsamen, wurden Experimente mit langkettigen Alkyl-Derivaten des TEA (C3-C10-TEA) durchgeführt. Diese längerkettigen TEA-Derivate interagieren mit zunehmender Länge der hydrophoben Alkylkette stärker mit den Aminosäuren der S6-Segmente (u.a. der T469), wodurch die Kopfgruppe des TEA, das Triethylammonium, zunehmend den Kontakt zur Stelle T441 in der Porenregion des Shaker-Kanals verliert (Choi et al., 1993) (Abb.1.8B+C). So wird die „C-type“ Inaktivierung durch C3-TEA nur noch wenig und durch C4-, C6-, C8- und C10-TEA nicht mehr verlangsamt. Im Weiteren wurden Experimente mit Substanzen, welche sich durch eine andere Kopfgruppe u.a. Diethylmethyl-propylammoniumbromid (DMPA) (Abb.1.8A) oder Seitenkette u.a. Lidocain-N-ethyl-Bromid (QX314) (Abb.1.8A) vom TEA unterscheiden, durchgeführt. Das DMPA zeigte keinerlei Verlangsamung der „C-type“ Inaktivierung, während das QX314 diese, ähnlich dem C3-TEA, moderat verlangsamt (Abb.1.8C). Zusammenfassend kann formuliert werden, dass die Kopfgruppe Triethylammonium des TEA und ein enger Kontakt dieser zur Aminosäure T441 des Shaker-Kanal obligat ist, um die „C-type“ Inaktivierung zu verlangsamen.



**Abbildung 1.8: Model zur Veranschaulichung der Verlangsamung der „C-type“ Inaktivierung durch TEA(-Derivate).**

**A** Strukturformeln. **B** Die Kopfgruppe, Triethylammonium, der „open-channel“ Blocker interagiert mit der Aminosäure T441 im Porenbereich des Shaker-Kanals. Mit zunehmender Länge der hydrophoben Seitenkette der „open-channel“ Blocker verstärken sich die Wechselwirkungen mit der Aminosäure T469 im Bereich des S6-Segmentes. **C** Die „open-channel“ Blocker können daher hinsichtlich ihres allosterischen Effektes in drei Gruppen eingeteilt werden. Zur ersten Gruppe mit dem größten allosterischen Effekt gehört nur das TEA. Es bindet bei kurzer Alkylkette und einer Triethylammonium-Kopfgruppe (●) bevorzugt an der Aminosäure T441. Die zweite Gruppe schließt das C3-TEA und das QX314 mit einem nur moderaten allosterischen Effekt ein, da sie gleich stark mit Aminosäuren der Pore und des S6-Segmentes interagieren. Die „open channel“ Blocker der dritten Gruppe erzeugen keinen allosterischen Effekt, da sie entweder aufgrund ihrer langen Alkylkette (C4-C10-TEA) starke Interaktionen mit dem S6-Segment eingehen oder wie das DMPA trotz kurzer Seitenkette keine Triethylammonium-Kopfgruppe (■) aufweisen (modifiziert nach Baukrowitz und Yellen, 1996).

## 1.5 (Patho)Physiologie des Shaker-, Kv2.1- und Kv3.1-Kanals

In dieser Promotionsarbeit wurden der Shaker IR ( $\Delta 6-46$ )-, Kv2.1- und Kv3.1-Kanal näher untersucht und sollen deshalb in diesem Abschnitt eingeführt werden. Prinzipiell unterscheidet man Kv-Kanäle vom A-Typ und „Delayed-Rectifier“ (DR)- Kanäle. Die meisten Kv $\alpha$ -Untereinheiten verschlüsseln einen DR-Kanal (Chandy and Gutman, 1995). In diese Gruppe sind auch der Shaker IR ( $\Delta 6-46$ )-, der Kv2.1- und Kv3.1-Kanal einzuordnen. Der Shaker **IR** (inactivation removed)- Kanal wurde ausgewählt, da dieser nach Deletion der Aminosäuren 6-46 im Bereich des N-Terminus im Gegensatz zum Wildtyp nicht mehr „N-type“ inaktiviert.

DR-Kanäle aktivieren mit zeitlicher Verzögerung („Delay“) und inaktivieren langsam. Sie beenden die Membrandepolarisationsphase des Aktionspotentials durch einen Kaliumauswärtsstrom. Damit erlauben sie z.B. hohe Aktionspotentialfrequenzen in bestimmten Neuronentypen (Lien and Jonas, 2003). Das Verhalten der Kv-Kanäle vom A-Typ soll im Rahmen dieser Arbeit nur kurz erwähnt werden. Kv-Kanäle vom A-Typ inaktivieren rasch durch die „N-type“ Inaktivierung. Die Repolarisationsphase der Neurone ist folglich länger und die Aktionspotentialfrequenz im Vergleich zu den DR-Kanälen sehr viel geringer (Connor and Stevens, 1971).

Der Shaker-Kanal war die erste klonierte Gensequenz der Fruchtfliege „*Drosophila melanogaster*“ (Kamb et al., 1987; Papazian et al., 1987). Er ist mitverantwortlich für das Schütteln („Shaking“) des Insektes nach einer Exposition mit Ether. Die humanen spannungsabhängigen Kaliumkanäle werden in den verschiedensten Organen und Geweben exprimiert. Das Ruhemembranpotential, die Amplitude und Frequenz eines Aktionspotentials sowie die Modulation der (Neuro)Transmitterausschüttung werden je nach Kv-Kanalart bzw. Subfamilie auf unterschiedliche Art und Weise reguliert (Frech et al., 1989; Hille, 2001).

Die Kv2.1-Kanäle sind u.a. Bestandteil in nahezu allen Neuronen und inhibitorischen Interneuronen des Kortex sowie des Hippocampus. In Zellkörpern und Dendriten vorkommend regulieren sie maßgeblich die neuronale Erregbarkeit (Murakoshi and Trimmer, 1999; Du et al., 2000; Misonou et al., 2005). Die Kv3.1- Kanäle hingegen sind



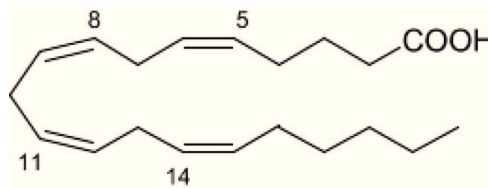
nur in bestimmten Arealen im Gehirn beispielsweise den GABAergen Interneuronen (Rettig et al., 1992) des Neocortex, des Hippocampus (Erisir et al., 1999) und in den Basalganglien (Joho et al., 2006) vertreten. Sie werden dabei sowohl in den Zellkörpern als auch an den Synapsen exprimiert (Goldberg et al., 2005). Nach aktuellem Wissensstand geht man davon aus, dass die Kv3-Subfamilie maßgeblich Einfluss auf die Ausschüttung des inhibitorischen Neurotransmitters GABA nimmt. Die klinisch sichtbaren Auswirkungen bei Verlust des Kv3.1-Genes konnten in experimentellen Untersuchungen mittels „knock-out“ Mäusen (Kv 3.1-/-) gezeigt werden. Auffällig bei den Kv 3.1-/- Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen (Kv3.1+/+) war eine gesteigerte Bewegungsbereitschaft und Schlaflosigkeit (Joho et al., 2006). Die Skelettmuskulatur der Tiere wies eine verlangsamte Kontraktion und Relaxation auf (Ho et al., 1997; Sánchez et al., 2000).

Einen weiteren großen Anteil haben die Kv2.1-Kanäle an der Regulation von Muskelzellen u.a. Herzmuskelzellen (Kuryshv et al., 2001) und glatten pulmonalen Gefäßmuskelzellen (Cox, 2005). Im Rahmen von hypoxischen Zuständen werden die Kv2.1-Kanäle der pulmonalen Gefäßmuskelzellen inhibiert, was zu Depolarisationen der Zellmembranen mit nachfolgend erhöhtem Calciumeinstrom führt (Archer et al., 1998). Die daraus resultierende Vasokonstriktion bzw. Erhöhung des pulmonalen Widerstandes über einen langen Zeitraum hat ein Remodeling der Gefäßwände und eine sich daran anschließende Rechtsherzhypertrophie zur Folge. Derzeitig gibt es keinen kausalen Therapieansatz. In Tierversuchen wurde Ratten mit einer chronischen pulmonalen Hypertension Dichloroacetat appliziert. Dieser metabolische Modulator führte zur Aktivierung des Kv2.1-Kanals und bei längerem Einsatz zu dessen vermehrter Expression in den Zellmembranen. Sowohl der pulmonale Widerstand, das Gefäßremodeling als auch die Rechtsherzhypertrophie konnten unter der Therapie signifikant reduziert werden (Michelakis et al., 2002).

Zudem werden Kv2.1-Kanäle in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas exprimiert. Durch den Auswärtsstrom von Kaliumionen schließen die Calciumkanäle und die Glucose-abhängige Insulinsekretion wird limitiert. In experimentellen Versuchen wurden die Kv-Kanäle mittels TEA blockiert, was eine 2-4 fach höhere Insulinsekretion zur Folge hatte (MacDonald et al., 2001). Im Rahmen der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 stellen die Kv-Kanäle einen neuen therapeutischen Ansatz dar (MacDonald et al., 2003).

## 1.6 Freisetzung der PUFA Arachidonsäure und ihrer Metabolite

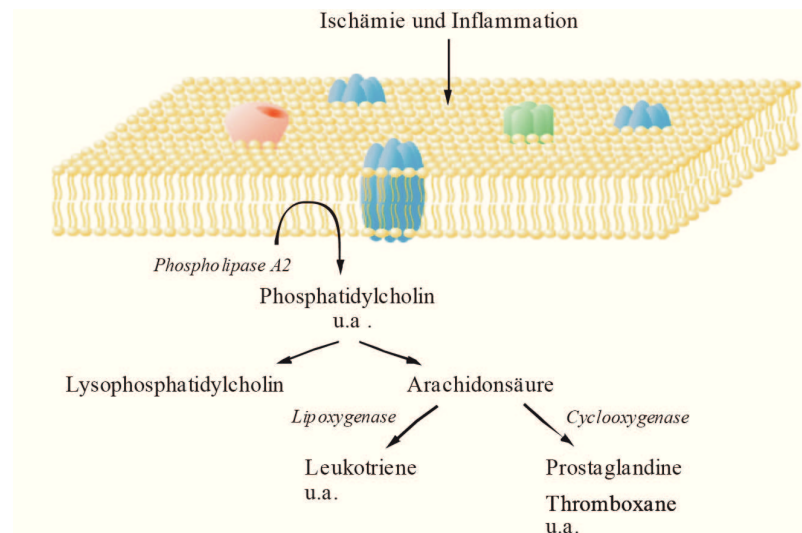
Die Arachidonsäure (Nomenklaturname: 5, 8, 11, 14-Eikosatetraensäure) ist eine universell in tierischen Zellen vorkommende vierfach ungesättigte Fettsäure, welche sich aus 20 Kohlenstoffatomen zusammensetzt und der großen Gruppe der Eikosanoide angehört.



**Abbildung 1.9: Strukturformel der Arachidonsäure,**  
Summenformel ( $C_{20}H_{32}O_2$ ).

Ein großer Anteil der Arachidonsäure im Organismus liegt dabei in gebundener und damit physiologisch inaktiver Form als Bestandteil von Phospholipiden in Zellmembranen vor. Die Freisetzung in den Zellen wird durch eine Vielzahl sogenannter Neuromodulatoren (bspw. Glutamat, Acetylcholin, Serotonin, Histamin und Bradykinin), im Rahmen von inflammatorischen Prozessen, Asthma oder Autoimmunerkrankungen (Triggiani et al., 2006) sowie Stresssituationen (u.a. Ischämien) in zahlreichen Geweben bzw. Organen (Herz, ZNS, Haut, Muskel) angeregt (Ghosh et al., 2006). Dabei hydrolysiert hauptsächlich das Enzym Phospholipase A2 (PLA2) (Six and Dennis, 2000;) die Esterbindung am zweiten Kohlenstoffatom (zweite Hydroxylgruppe) des Glycerins im Phospholipid (u.a. Phosphatidylcholin). Es entstehen Arachidonsäure und Lysophosphatidylcholin. Die Arachidonsäure kann sich aufgrund ihres amphipathischen Charakters frei in der Zellmembran bewegen und weitere Interaktionen eingehen. Dabei durchspannt der unpolare lipophile Schwanz der Fettsäure die erste Schicht der Lipiddoppelmembran und die polare hydrophile Carboxylat-Gruppe befindet sich an der Membranoberfläche. Durch membranständige Enzyme wie die Cyclooxygenase bzw. die Lipoxygenase werden die Doppelbindungen der Arachidonsäure modifiziert und

es entstehen biologisch aktive Metabolite wie z.B. Thromboxan, Prostaglandine und Prostacyclin bzw. Leukotriene (Abb.1.10). Die genannten Substanzen werden u.a. im Endothel, in der glatten und quergestreiften Muskulatur, in Gliazellen und Neuronen, in Thrombozyten, Granulozyten und Makrophagen/Mastzellen gebildet. Diese sind teilweise sehr vasoaktiv, vermitteln Entzündungsreaktionen und Schmerzentstehung sowie Thrombozytenaggregation und Chemotaxis.



**Abbildung 1.10: Arachidonsäuremetabolismus** ([www.lipidsignalling.de](http://www.lipidsignalling.de))

## 1.7 Wirkung von Arachidonsäure auf Ionenkanäle

Die Arachidonsäure reguliert eine Vielzahl von Ionenkanälen auf unterschiedliche Art und Weise. Dazu zählen unter anderen die spannungsabhängigen Kalium-, Calcium- und Natriumkanäle sowie die K2P-Kaliumkanäle. Die Kv-Kanäle werden unter Abschnitt 1.8 separat besprochen.

Die Arachidonsäure wird in ischämischen Herzmuskelzellen aus den membranständigen Phospholipiden vermehrt gelöst und in das Zytoplasma abgegeben (Huang et al., 1992). Spannungsabhängige Calciumkanäle in ventrikulären Kardiomyozyten werden dabei aktiviert und fördern den Einstrom von Calcium in die Zelle und somit Arrhythmien mit darauf folgender Nekrose. Die Beteiligung von Metaboliten der Arachidonsäure

wurden hierbei experimentell ausgeschlossen. Einen kardioprotektiven Effekt wiederum hat die Arachidonsäure durch seine Wirkung auf spannungsabhängige Natriumkanäle. Die Natriumkanäle in Kardiomyozyten der Ratte werden durch die Arachidonsäure reversibel inhibiert und hyperpolarisieren das Membranpotential, wodurch die Refraktärzeit verlängert und dem Kardiomyozyt das Überleben im Rahmen von Ischämie- oder Reperfusionprozessen ermöglicht wird (Bendahhou et al., 1997).

Im zentralen Nervensystem geht man nach dem heutigen Wissenstand davon aus, dass die PUFA einen neuroprotektiven Effekt auf unter anderem globale Ischämien (Lauritzen et al., 2000), epileptische Anfälle (Vreugdenhil et al., 1996), Depression (Hibbeln, 1998) sowie bipolare und andere Verhaltensstörungen (Stoll et al., 1999) haben können. In den letzten Jahren wurde eine neue Klasse von Kaliumkanälen, welche zwei Poren ausbilden und aus insgesamt vier Transmembransegmenten (K2P-Kaliumkanäle) bestehen, sowohl im Gehirn (Kim et al., 1995; Fink et al., 1996; Hervieu et al., 2001) als auch im Herz (Kim and Clapham, 1989) identifiziert. Einige K2P-Kaliumkanäle werden durch Arachidonsäure und andere PUFA aktiviert (Patel et al., 1998; Lesage and Lazunski, 2000). Diese Aktivierung führt in den Neuronen vermutlich zu einer reduzierten Glutamatausschüttung an der präsynaptischen Membran. Zusätzlich wird die postsynaptische Membran hyperpolarisiert, wodurch die Blockade der NMDA-Rezeptoren durch Magnesiumionen aufrecht erhalten werden kann. Depolarisationen und die Frequenz von Aktionspotentialen durch die Aktivierung anderer Glutamatrezeptoren können auf diese Art und Weise gesenkt werden und die Neuronen somit vor dem Untergang bewahren (Xiao and Li, 1999; Lauritzen et al., 2000). Erste therapeutische Ansätze und auch Erfolge u.a. in der Therapie der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) konnten mit dem Arzneimittel Riluzol erzielt werden. Riluzol ist ein Benzothiazol-Derivat, welches K2P-Kaliumkanäle permanent öffnet (Duprat et al., 2000) und somit zum einen die Glutamatfreisetzung hemmt, postsynaptisch spannungsabhängige Natriumkanäle inaktiviert und zum anderen indirekt die Aktivierung von Glutamatrezeptoren moduliert.

## 1.8 Inhibition von Kv-Kanälen durch Arachidonsäure

Die Arachidonsäure ist seit einigen Jahren als direkter Kv-Kanalmodulator bekannt. Versuche an Kardiomyozyten ergaben, dass Kv1.5-Kanäle durch Arachidonsäure inhibiert werden können (Honore et al., 1994). Als Wirkmechanismus wird ein direkter „open-channel“ Block der Kv1.5-Kanäle von der extrazellulären Seite diskutiert. Im Rahmen von Ischämien am Herzmuskel kommt es zur vermehrten Freisetzung von Arachidonsäure aus den membranständigen Phospholipiden in das Zytoplasma (Huang et al., 1992). Eine Inhibition von Kv1.5-Kanälen könnte unter bestimmten Bedingungen antiarrhythmisch wirken. Die antiarrhythmische Wirkung von Arachidonsäure konnte bisher jedoch noch nicht direkt gezeigt werden. Seit einigen Jahren ist ein Klasse III Antiarrhythmikum namens Tedisamil auf dem Markt, welches ebenfalls Kv1.5-Kanäle im Herzen blockiert. Tedisamil wirkt bradykardisierend mit antiischämischen und antiarrhythmischen Eigenschaften.

Im Weiteren werden die spannungsabhängigen Kaliumkanäle in großer Zahl in den CA1-Neuronen des Hippocampus (Maletic-Savatic et al., 1995) exprimiert. Die postsynaptischen Kv-Kanäle vom A-Typ (Kv4.2-Kanal) werden unter physiologischen Bedingungen durch eine synaptische Depolarisation aktiviert und regulieren effektiv die Aktionspotentialfrequenzen- und amplituden (Hoffman et al., 1997; Ramakers and Storm, 2002). In experimentellen Untersuchungen wurden die Kv4.2-Kanäle mittels Arachidonsäure inhibiert (Villaroel and Schwarz, 1996). Die Autoren gehen von einer direkten Interaktion der ungesättigten Fettsäure mit dem Kanal selbst oder mit eng benachbarten Zellmembrankomponenten aus. Mutationen der Aminosäuresequenz des Kv4.2-Kanals lassen vermuten, dass der „S4-S5 linker“ Einfluss auf die PUFA-Inhibition hat, der N-Terminus hingegen nicht. Die beschleunigte Inhibitionsrate der Kv4.2-Kanäle hat länger andauernde Aktionspotentiale und somit eine gesteigerte Erregbarkeit der Neuronen zur Folge. In diesem Zusammenhang diskutieren Autoren die Möglichkeit, dass verlängerte Aktionspotentiale zu einem vermehrten Calciumeinstrom in die Zellen bzw. Mitochondrien führt, was u.a. die oxidative Phosphorylierung stimuliert und die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies fördert. Auch Keros and McBain postulierten 1997, dass Arachidonsäure im Rahmen von oxidativen Stress

(Ischämien oder Epilepsien) durch die Inhibition des Kv4.2-Kanals zu einem massiveren Neuronenschaden führen könnte.

Im Weiteren gilt zu erwähnen, dass Kv1.3-Kanäle in der Zellmembran von T-Lymphozyten vorkommen und eine wichtige Rolle im Rahmen der Immunantwort u.a. der Multiplen Sklerose spielen. Bei der Multiplen Sklerose handelt es sich vermutlich um eine T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung, wobei es zu Myelin- und Markscheiden-schädigungen im zentralen Nervensystem kommt. Aus Experimenten mit T-Zellen ist bekannt, dass autoreaktive T-Lymphozyten Kv1.3-Kanäle überexprimieren (Beeton et al., 2001). Nach Blockade derer mittels selektiven Blockern kann die T-Zellproliferation verhindert werden (Beeton et al., 2001). Auch die Arachidonsäure und andere mehrfach ungesättigte Fettsäuren beeinflussen die Kv1.3-Kanäle in T-Lymphozyten (Szekely et al., 2007). Ob und inwieweit die ungesättigten Fettsäuren einen ähnlichen Effekt auf die Proliferation autoreaktiver T-Lymphozyten haben, ist derzeit leider nicht bekannt. Trotzdem könnte die selektive Blockade der Kv1.3-Kanäle in der Zukunft einen Therapieansatz der Multiplen Sklerose darstellen, um dem Fortschreiten der Erkrankung entgegen zu wirken.

Die Bedeutung der Kv2.1-Kanäle in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas ist bereits erläutert worden. In Experimenten mit  $\beta$ -Zellen der Maus und Insulinomzellen konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung von Arachidonsäure die Kv2.1-Kanäle inhibiert und dadurch zur gesteigerten Insulinsekretion führt. Im Weiteren wurden die Zellen mit Glucose stimuliert. Die erhöhten Glucosespiegel hatten jedoch nicht nur eine vermehrte Insulinsekretion sondern auch eine gesteigerte Aktivität der Phospholipase A2 in der Zellmembran und somit eine erhöhte Arachidonsäure-Abgabe in das Zytoplasma zur Folge (Jacobsen et al., 2007).

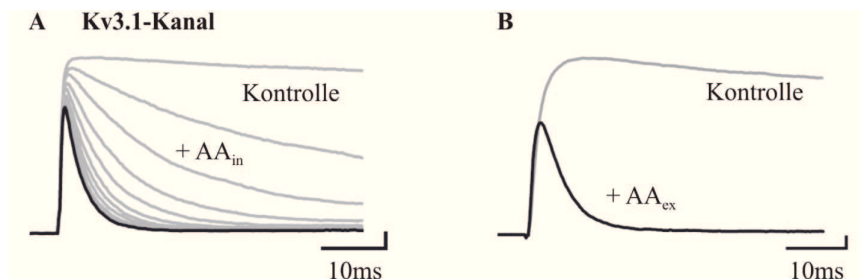
In der Literatur gibt es viele interessante Beispiele wie PUFA Kv-Kanäle und damit (patho)physiologische Mechanismen in den verschiedensten Geweben und Organen modulieren könnten. Es muss hier aber betont werden, dass diese (patho)physiologischen Mechanismen derzeitig eher hypothetischen Charakter besitzen und in vielen Fällen eine klare experimentelle Bestätigung noch erbracht werden muss.

Das Wissen über Wirkmechanismen der PUFA speziell an den Kv-Kanälen ist gegenwärtig Gegenstand wissenschaftlicher Debatten. Zwei Hypothesen werden im folgenden Abschnitt vorgestellt.

## 1.9 Hypothesen zum Wirkmechanismus der PUFA-Inhibition in Kv-Kanälen

### 1.9.1 PUFA induzieren eine Konformationsänderung im Selektivitätsfilter

Oliver et al. testeten die Wirkung der Arachidonsäure (AA) auf verschiedene Kv-Kanäle vom A-Typ und DR-Typ. Es konnte gezeigt werden, dass die PUFA beide Kanalentitäten spannungsabhängig inhibiert. Die inhibierende Wirkung der Kv-Kanäle durch AA setzt jedoch nicht sofort ein. Bis zum Erreichen des „steady states“ der Inhibition sind wiederholte Aktivierungen der Kv-Kanäle nötig, sodass, wie in Abb.1.11A gezeigt, ein Transient entsteht. Die Dauer bis zur vollständigen Inhibition ist von der applizierten AA-Konzentration abhängig. Oliver et al. konnten zeigen, dass für die vollständige Inhibition der Kv3.1-Kanäle sowohl von intra- als auch von extrazellulär (Abb.1.11B) appliziert bereits  $4\mu\text{M}$  AA ausreichen ( $\text{IC}_{50} = 0,08 \pm 0,04\mu\text{M}$ ).



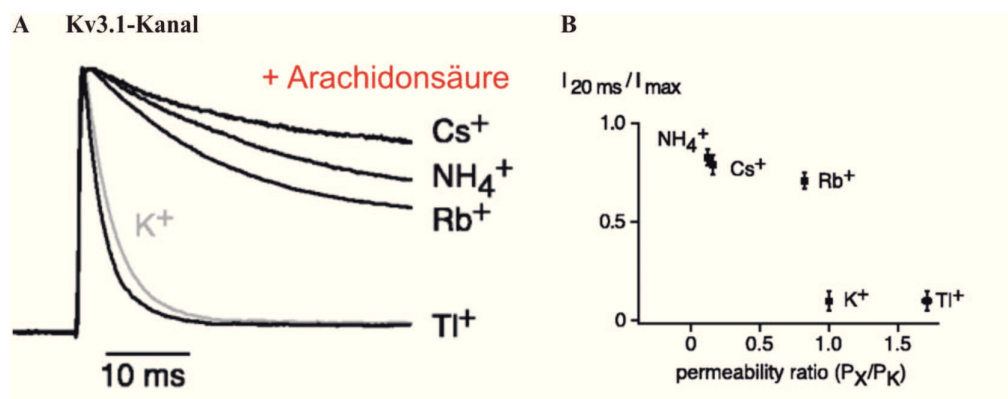
**Abbildung 1.11: Wirkung von  $4\mu\text{M}$  intra (A)- bzw. extrazellulär (B) applizierter Arachidonsäure auf Kv3.1-Kanäle.**

Die Aufzeichnung der Auswärtsströme erfolgte in einem Intervall von zwei Sekunden (modifiziert nach Oliver et al., 2004).

Davon ausgehend untersuchten Oliver et al. folgende Wirkmechanismen der PUFA-Inhibition: „open-channel“ Block versus einer Konformationsänderung im Selektivitätsfilter.

Zum einen wurde die Wirkung verschiedener intrazellulärer Ionen auf die Arachidonsäure-Inhibition von Kv3.1-Kanälen getestet. Interessanterweise war diese in Anwesenheit

von Rubium-, Ammonium- oder Cäsiumionen stark reduziert. Gegensätzlich dazu verhielten sich die Thalliumionen, wodurch die AA-Inhibition im Vergleich zu Experimenten mit Kaliumionen sogar noch etwas beschleunigt war (Abb.1.12A). Diese Effekte korrelieren mit dem Permeabilitätsverhältnis  $P_X/P_{K^+}$ , wobei  $P_X$  die Permeabilität des Ion X und  $P_{K^+}$  die Permeabilität der Kaliumionen ist. Die Ionen  $Rb^+$ ,  $NH_4^+$  und  $Cs^+$  werden schlechter geleitet als  $K^+$  und schwächen die PUFA-Inhibition ab.  $Tl^+$  hingegen mit einer besseren Permeabilität als  $K^+$  fördern die PUFA-Inhibition (Abb.1.12B).



**Abbildung 1.12: Ionenabhängigkeit der PUFA-Inhibition.**

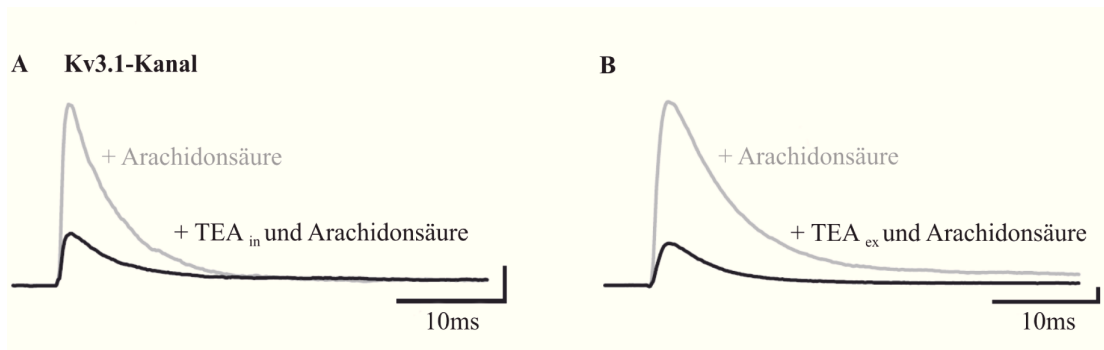
**A** Die Inhibition der Kv3.1-Kanäle durch  $4\mu M$  AA ist stark vom permeierenden Ion abhängig. Während die Inhibition durch  $Rb^+$ ,  $NH_4^+$  und  $Cs^+$  stark abgeschwächt wird, beschleunigt  $Tl^+$  diese. Die Restströme wurden an die initiale Stromgröße angepasst. Zur Aktivierung der Kanäle im „inside-out“ Patch erfolgte ein Spannungssprung auf  $+60mV$  bei intrazellulär  $124mM$  des entsprechenden Ions und extrazellulär  $5mM$   $K^+$ . **B** Auftragung der Inhibition durch AA nach 20ms/maximale Inhibition ( $I_{20ms}/I_{max}$ ) gegen das Permeabilitätsverhältnis ( $P_X/P_{K^+}$ ) (modifiziert nach Oliver et al., 2004).

Um die PUFA-Inhibition näher zu charakterisieren wurde die Wirkung von intra- und extrazellulärem TEA (Tetraethylammonium), einen „open-channel“ Blocker der Kv-Kanäle, auf AA-inhibierte Kv3.1-Kanäle untersucht (Oliver et al., 2004). Anhand der Abb.1.13 wird deutlich, dass intrazelluläres TEA die PUFA-Inhibition nicht beeinflusst, was im Falle einer Konkurrenz des TEA und der Arachidonsäure um eine Bindungsstelle im Bereich des Poreneingangs jedoch zu erwarten gewesen wäre. Auch extrazelluläres TEA hatte keine Wirkung auf die AA-Inhibition. Dies impliziert, dass die Wirkung von TEA und der Arachidonsäure auf Kv3.1-Kanäle zwei unterschiedlichen



Mechanismen unterliegen.

Oliver et al. vermuten daher, dass die PUFA-Inhibition durch Konformationsänderungen im Bereich der Pore (Selektivitätsfilter) (Abb.1.16B) abläuft und daher durch  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$  und  $\text{Cs}^+$  verhindert werden kann (Oliver et al., 2004).



**Abbildung 1.13: Wirkung von intra- und extrazellulärem TEA auf die PUFA-Inhibition.**

**A** Die durch  $4\mu\text{M}$  AA induzierte Inhibition ist weder durch  $30\text{mM}$  intrazelluläres noch durch **B**  $0,3\text{mM}$  extrazelluläres TEA beeinflussbar (modifiziert nach Oliver et al., 2004).

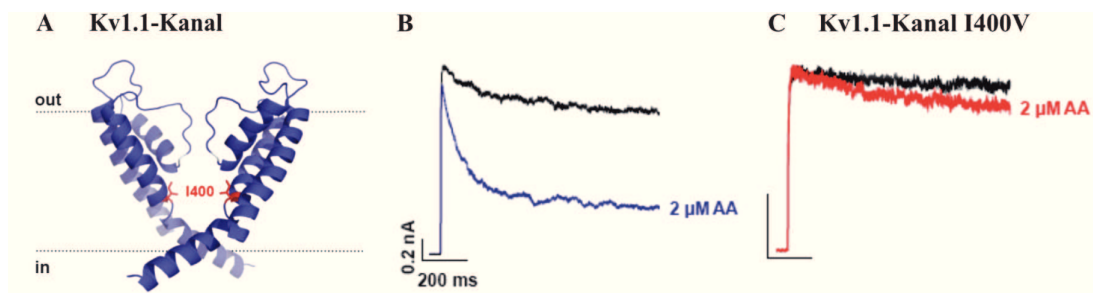
### 1.9.2 PUFA binden als „open-channel“ Blocker in der Pore

Die Arbeitsgruppe von Niels Decher (Universität Marburg) (Decher et al., 2010; Moreno-Galindo et al., 2010) identifizierten erstmals Interaktionsstellen von PUFA an verschiedenen Kv-Kanälen. Dabei wurde beispielsweise das Isoleucin an der Stelle 400 zu Valin am Kv1.1-Kanal mutiert (Bhalla et al., 2004) und deren PUFA-Empfindlichkeit getestet. Die Aminosäure I400 ist der Pore zugewandt und befindet sich im mittleren Bereich des S6-Segmentes. Der Wildtyp des Kv1.1-Kanals inaktivierte nach Applikation von  $2\mu\text{M}$  Arachidonsäure auf ein „inside-out“ Patch unvollständig, während der Kv.1.1<sup>I400V</sup>-Kanal keinerlei Inhibition zeigte (Abb.1.14).

Der Austausch des Isoleucin gegen Valin an der Stelle 400 des Kv1.1-Kanals findet auch im Rahmen der RNA-Edition in verschiedenen Regionen des menschlichen Gehirns u.a. im Thalamus, Rückenmark und der Medulla oblongata statt. Die RNA-Edition ist eine wichtige Form der posttranskriptionellen Modifikation, wodurch einzelne Nukleinbasen

der mRNA ausgetauscht werden. Dies führt zu einer wesentlich höheren Proteinvierfalt.

Decher et al. konnten zeigen, dass nicht nur die PUFA-Inhibition sondern auch die Blockade durch etablierte „open channel“ Blocker der Kv-Kanäle (u.a. AVEO118 und Psora-4), welche am S6-Segment binden, am Kv1.1<sup>I400V</sup>-Kanal stark abgeschwächt war. Die Edition des Kv1.1-Kanals hat somit eine besondere physiologische Bedeutung, da sie die (pharmakologischen) Eigenschaften bestimmter Regionen im Gehirn verändert.



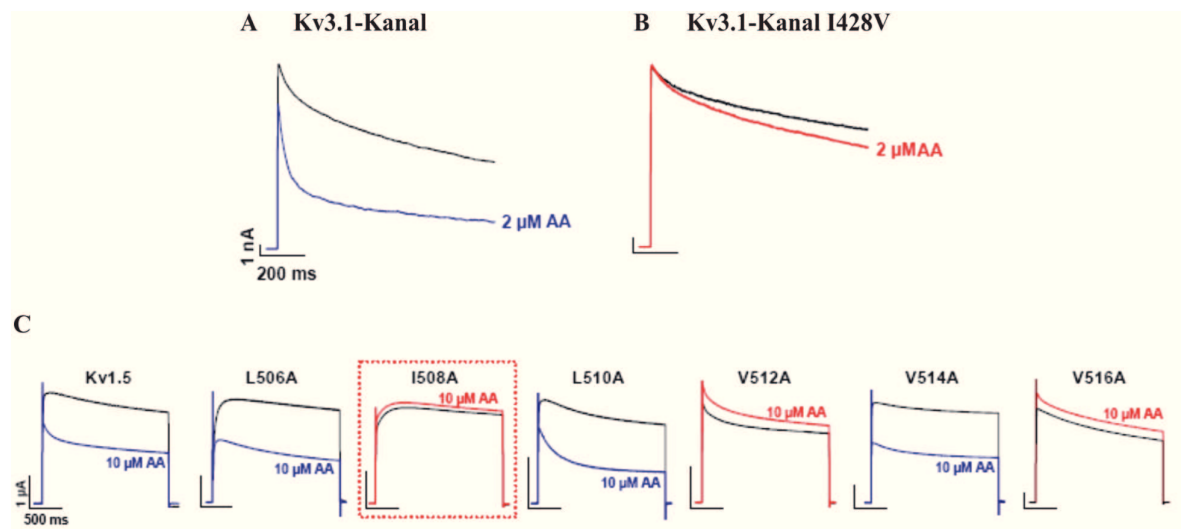
**Abbildung 1.14: Wirkung von PUFA auf den Kv1.1-Kanal und Kv1.1<sup>I400V</sup>-Kanal.**

**A** Lokalisation der Aminosäure I400 in der Pore. Applikation von 2 µM AA auf ein „inside-out“ Patch mit **B** Kv1.1-Kanälen und **C** Kv1.1<sup>I400V</sup>-Kanälen. Die Kv1.1-Kanäle werden unvollständig inaktiviert, während die Kv1.1<sup>I400V</sup>-Kanäle nicht inaktivieren. Zur Aktivierung der Kanäle erfolgte ein Spannungssprung auf +40mV (modifiziert nach Decher et al., 2010).

Das Isoleucin 400 ist in allen Kv-Kanälen konserviert und im mittleren Bereich des S6-Segmentes lokalisiert. Demzufolge kann diese Punktmutation auch im Kv3.1(I428V)- und Kv1.5 (I508A)-Kanal eingeführt werden. Während der Kv3.1-Kanal, ähnlich dem Kv1.1-Kanal, durch 2 µM AA unvollständig inaktiviert, ist am Kv3.1<sup>I428V</sup>-Kanal nahezu keine Inhibition sichtbar (Abb.1.15A+B). Auch der Kv1.5-Kanal, welcher in *Xenopus* Oocyten exprimiert und gemessen wurde, wird nach Applikation von 10 µM AA inhiert. Nach Einführung der entsprechenden Punktmutation I508A ist auch am Kv1.5-Kanal keine Inhibition mehr sichtbar (Abb.1.15C).

Um den Interaktionsbereich der PUFA in der Kavität der Kv-Kanäle genauer charakterisieren zu können, wurden weitere Punktmutationen der entsprechenden Aminosäure zu Alanin an den Stellen 479-517 des Kv1.5-Kanals angefertigt (Decher et

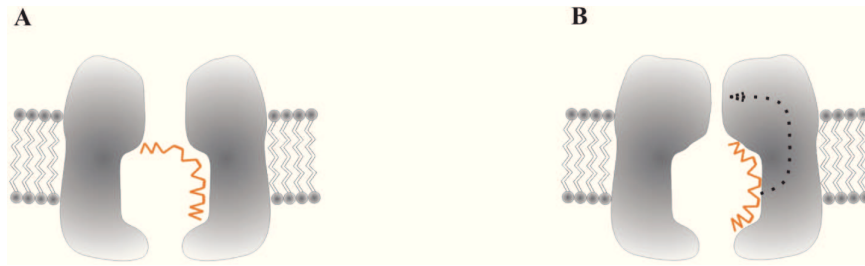
al., 2004; Decher et al., 2006) und die PUFA-Inhibition gemessen. Dabei fiel auf, dass Punktmutationen einer Poren zugewandten Aminosäure (L508A, V512A, V516A) eine deutlich abgeschwächte PUFA-Inhibition der Kv-Kanäle zeigten. Der Pore abgewandte Aminosäurereste (L506A, L510A, L514A) hingegen wurden durch PUFA gleichermaßen inhibiert wie der WT des Kv1.5-Kanals (Abb.1.15C). Decher et al. vermuten, dass



**Abbildung 1.15: Wirkung von PUFA auf Kv3.1- und Kv3.1<sup>I428V</sup>-Kanäle sowie Kv1.5- und Kv1.5<sup>L508A</sup>-Kanäle.**

Applikation von 2 μM AA auf ein „inside-out“ Patch mit **A** Kv3.1-Kanälen und **B** Kv3.1<sup>I428V</sup>-Kanälen. Die Kv3.1-Kanäle werden unvollständig inhibiert, während die Kv3.1<sup>I428V</sup>-Kanäle nicht inhibieren. **C** Der Pore zugewandte Aminosäurereste der Kv1.5-Kanäle (L508A, V512A, V516A) können durch 10 μM AA (rot) kaum abgeschwächt werden, während der Pore abgewandte Aminosäurereste (L506A, L510A, L514A) gleichermaßen potent wie der WT des Kv1.5-Kanals inhibieren. Zur Aktivierung der Kanäle erfolgte ein Spannungssprung auf +40mV (modifiziert nach Decher et al., 2010).

PUFA im geöffneten Zustand des Kanals in die Kavität unterhalb des Selektivitätsfilters eindringen, an den der Pore zugewandten Aminosäuren im S6-Segment binden und eine „open channel“ Blockade verursachen (Abb.1.16A).



**Abbildung 1.16: Hypothesen des Wirkmechanismus der PUFA-Inhibition an Kv-Kanälen.**

**A** „open-channel“ Blockade versus **B** Konformationsänderung am Selektivitätsfilter (Porenkollaps) durch Arachidonsäure (orange).

## 2 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit soll der Wirkmechanismus der Inhibition spannungsabhängiger Kaliumkanäle durch PUFA untersucht werden. Der Mechanismus einer direkten „open-channel“ Blockade und ein allosterischer Mechanismus werden in den folgenden Abschnitten gegenübergestellt und diskutiert.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Oocytenpräparation und Injektion mit cRNA

Als Expressionssystem für die Kv-Kanäle dienten Oocyten des *Xenopus laevis*, eine afrikanische Krallenfroschart. Jeder Frosch wurde höchstens vier mal operiert. Der Zeitabstand zwischen zwei aufeinander folgenden chirurgischen Eingriffen durfte dabei 12 Wochen nicht unterschreiten. Die Entnahme der Oocyten erfolgte nach Betäubung des Frosches mittels Tricain auf Flockeneis. Das gewonnene Material wurde anschließend über ca. 90min mit Kollagenase A behandelt und nach Beendigung der Aufarbeitung zeitnah manuell vereinzelt und defollikuliert. Die Aufbewahrung der Oocyten erfolgte die ganze Zeit über in Bath-Medium (Tabelle 3.1). Für die Injektion, 12 bis maximal 24 Stunden nach Entnahme, wurden lediglich Oocyten im Reifestadium IV nach Dumont (Dumont, 1972) verwendet.

In Vorbereitung der Injektion wurden die Borosilikatglaskapillaren (Durchmesser 2:1,6mm) mit einem Micropipettenpuller (Model P-97, Sutter Instruments & Co., USA) sehr fein ausgezogen und anschließend auf den gewünschten Öffnungsdurchmesser gebrochen. Nach sorgfältiger Auswahl der Oocyten erfolgte nun manuell unter mikroskopischer Sicht die Injektion mittels einer ausgezogenen Glaskapillare von ca. 100nl cRNA pro Oocyte. Die cRNA wurde bei -80°C eingefroren. Nach 24 bis höchstens 72 Stunden Aufbewahrung der Oocyten im Brutschrank bei 18°C waren die Kv-Kanäle exprimiert.

Die Experimente konnten anschließend je nach Qualität der Oocyten in einem Zeitfenster von einem Tag bis maximal zwei Wochen erfolgen. Unmittelbar vor Beginn der Messungen wurde die schützende Vitellinmembran der Oocyte entfernt und somit ein freier Zugang der Glaspipette zur Membran geschaffen.

## 3.2 Elektrophysiologische Untersuchungen mittels der „voltage-clamp“ Methode

Die Experimente wurden bei Raumtemperatur mittels der „voltage-clamp“ Technik (Spannungsklemme) durchgeführt, welche Hodgkin und Huxley im Jahr 1949 erstmalig beschrieben. Diese Methode machte es möglich Ionenströme und nicht nur den Verlauf des Membranpotentials präzise zu messen.

Als heterologes Expressionssystem dienten *Xenopus laevis* Oocyten. Die Oocyte befand sich während des Experimentes in einem großen Tropfen Kint-Lösung (Tabelle 3.1) auf einem dünnen Glasplättchen und wurde durch ein Objektiv des Carl Zeiss Mikroskops (Axiovert 25) um den Faktor 20 vergrößert. Das Applikationssystem, welches aus fünf miteinander verklebten Thetagläsern aus Borosilikatglas bestand, ragte ebenfalls in die Kint-Lösung. Dieses Röhrchensystem diente der Applikation von Lösungen auf die intrazelluläre Seite der Zellmembran. Die Reservoirgefäße der zu applizierenden Flüssigkeiten waren über jeweils einen Drei-Wege-Hahn und einem Teflonschlauchsystem mit dem Applikationssystem verbunden. Um einen schnellen Lösungsaustausch zu gewährleisten und Verschmutzungen vorzubeugen, wurde ständig frische Kint-Lösung über das Applikationssystem zugeführt und über eine Pumpe abgesaugt.

Über den sehr fein justierbaren Objektisch konnte unter mikroskopischer Sicht die Glaspipette in eine Ebene mit der Oocyte gebracht werden. Die Pipetten aus Borosilikatglas (Durchmesser 2:1,4mm) wurden mit einem Mikropipettenpuller (Model P-97, Sutter Instruments & Co., USA) gezogen und anschließend durch einen heißen Platindraht poliert („Microforge MF830“, Narishige Japan). Der Pipettenwiderstand schwankte zwischen 400-600k $\Omega$ .

Um eine optimale Anhaftung der Pipette an die Zellmembran zu erreichen, wurde die Pipettenspitze vor dem Befüllen in Paraffinöl getaucht. Denn um ein Membranstück aus dem Membranverband lösen zu können war ein Widerstand von mindestens einem G $\Omega$  zwischen Glas und Membran nötig. Alle „Giant patch-clamp“ Experimente erfolgten in der „inside-out“ Konfiguration.

Das anschließende Befüllen der Pipette mit Pipettenlösung (Tabelle 3.1) konnte durch ein Microfilament mit Spritze und Spritzenaufsatzfilter präzise durchgeführt werden. Im Weiteren wurde die Glaspipette auf eine chlorierte Silberelektrode, welche direkt

mit der „head-stage“ verbunden war, aufgesetzt. Eine weitere Elektrode befand sich in der Bad-Lösung und stand ebenfalls über ein Kabel mit der „head-stage“ in Verbindung. Die entstandenen Spannungen und Ströme wurden über den EPC9-Verstärker aufgenommen und mit einem Bessel Filter mit 3kHz gefiltert. Das Pulsprotokoll ergab einen Rechteckpuls von insgesamt 600ms Dauer. Die ersten 100ms des Pulses wurde der Kv-Kanal bei dem Haltepotential von -80mV geschlossen gehalten. In den darauf folgenden 400ms öffnete der Kv-Kanal durch einen Spannungssprung auf +40mV und schloss erneut durch einen Sprung zurück auf -80mV in den letzten 100ms des vorgegebenen Pulses. Die Aufnahmefrequenz betrug 1kHz. Bei dem beschriebenen Rechteckpuls handelt es sich um das Standardprotokoll. Abweichungen werden sowohl im Text als auch in der jeweiligen Abbildung angegeben.



### 3.3 Rezepte verwendeter Lösungen und Chemikalien

**Tabelle 3.1:** Verwendete Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
Bath-Medium	4mM NaCl, 2,4mM NaHCO <sub>3</sub> , 1mM KCl, 0,82mM MgSO <sub>4</sub> , 0,41mM CaCl <sub>2</sub> und 0,33mM Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O, 7,5mM TRIS, Penicillin/Streptomycin und Cefuroxim, pH 7,4 mit HCl eingestellt
Kint-Lösung	120mM KCl, 10mM HEPES, 2mM EGTA und 1mM Pyrophosphat, pH 7,2 mit KOH eingestellt
RbCl-Lösung	120mM RbCl, 10mM HEPES, 2mM EGTA und 1mM Pyrophosphat, pH 7,2 mit RbOH eingestellt
NMDG-Lösung	120mM NMDG, 10mM HEPES, 2mM EGTA und 1mM Pyrophosphat, pH 7,2 mit HCl eingestellt
30mM KCl-Lösung	30mM KCl, 150mM NMDG, 10mM HEPES, 2mM EGTA und 1 mM Pyrophosphat, pH 7,2 mit HCl eingestellt
KCl-Pipetten-Lösung	120mM KCl, 10mM HEPES und 1,8mM CaCl <sub>2</sub> , pH 7,2 mit KOH eingestellt
RbCl-Pipetten-Lösung	120mM RbCl, 10mM HEPES und 1,8mM CaCl <sub>2</sub> , pH 7,2 mit RbOH eingestellt
180mM KCl-Pipettenlösung	180mM KCl, 10mM HEPES und 1,8mM CaCl <sub>2</sub> , pH 7,2 mit KOH eingestellt
180mM RbCl-Pipettenlösung	180mM RbCl, 10mM HEPES und 1,8mM CaCl <sub>2</sub> , pH 7,2 mit RbOH eingestellt
NaCl-Pipetten-Lösung	120mM NaCl, 10mM HEPES und 1,8mM CaCl <sub>2</sub> , pH 7,2 mit NaOH eingestellt
NMDG-Pipetten-Lösung	120mM NMDG, 10mM HEPES und 1,8mM CaCl <sub>2</sub> , pH 7,2 mit HCl eingestellt

#### Bezugsquellen der Chemikalien:

SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen:

Arachidonsäure, Arachidonoyl-CoA, Anandamid, Genistein, Östrogen, Lysophosphatidylcholin, Lysophosphatidylinositol, Tetraethylammonium-Chlorid, Dimethylhexylamin und QX314 (Lidocain N-ethyl Bromid).

Prof. Gary Yellen, Harvard University, Boston:  
 Propyltriethylammonium-Bromid (C3-TEA),  
 Butyltriethylammonium-Bromid (C4-TEA),  
 Hexyltriethylammonium- Bromid (C6-TEA),  
 Octyltriethylammonium-Bromid (C8-TEA)  
 und Decyltriethylammonium-Bromid (C10-TEA).

Alle aufgeführten Substanzen wurden in speziellen Lösungsmitteln gelöst, als Stammlösung bei -20°C eingefroren und erst am Tag ihrer Verwendung auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Alle ungesättigten Fettsäuren, Steroidhormone und Lysophospholipide wurden zusätzlich vor Gebrauch 10 Minuten in einem Eisbad sonifiziert.

**Tabelle 3.2:** Verwendete Lösungsmittel für die Substanzen

Lösungsmittel	gelöste Substanz
DMSO	Arachidonsäure, Anandamid, Arachidonyl-CoA, Genistein, Östrogen
Chloroform, Methanol und Wasser (70:27:3 vol%)	Lysophosphatidylcholin, Lysophosphatidylinositol
Wasser	TEA, TEA-Derivate (C3-C10-TEA), QX314, DMHA

### 3.4 Datenaufnahme und Datenauswertung

Die Datenaufnahme erfolgte mit einem Apple Macintosh 7600/132 Computer. Die Softwareprogramme Pulse++ und EPC9-screen (HEKA electronics in Deutschland) dienten der Aufzeichnung von Messdaten. Zur weiteren Datenanalyse und Auswertung standen das Programm IGOR Pro Version 3.14 (WaveMetrics, Inc., USA) und Excel Mac 2001 (USA) zur Verfügung. Die Darstellung der Messkurven bzw. Diagramme erfolgte mit dem Grafikprogramm Canvas Version 7 (Deneba Systems, USA).

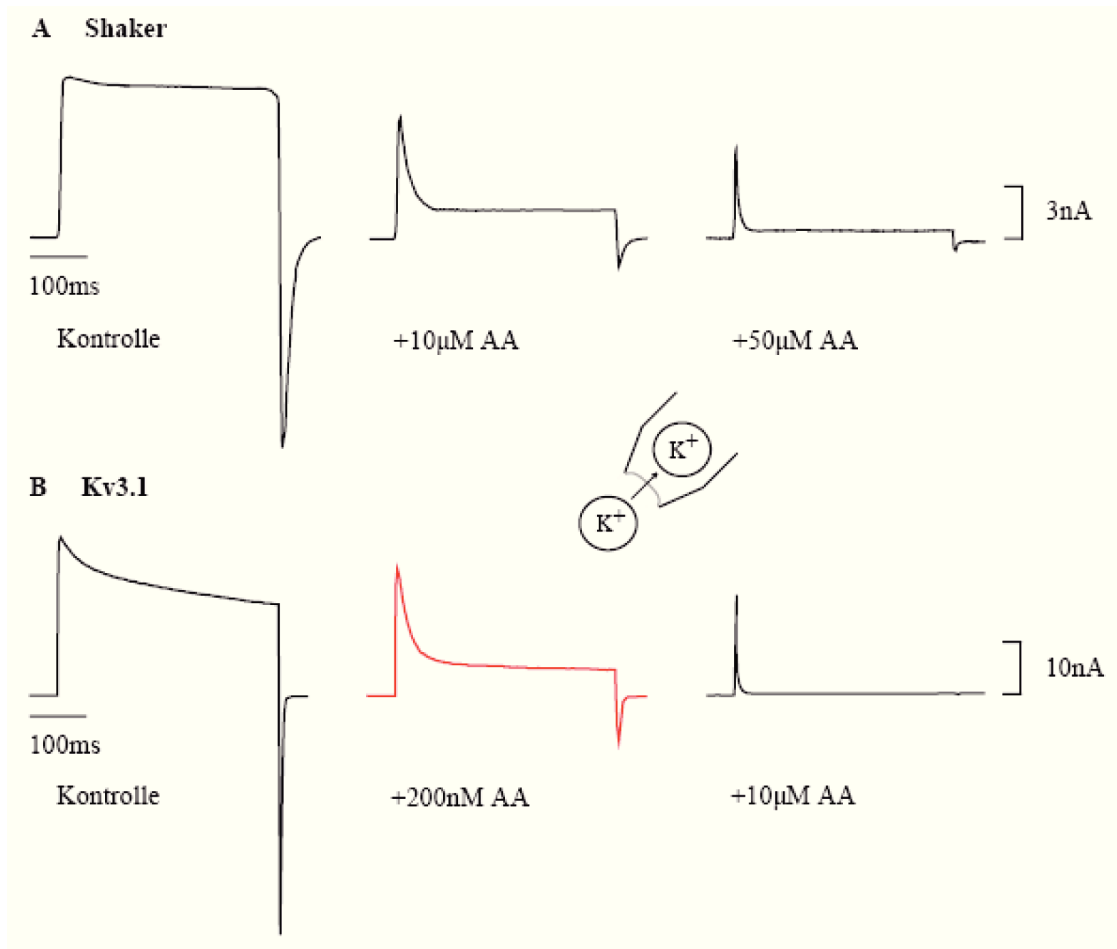
Alle angegebenen Mittelwerte sind immer Mittelwerte aus mindestens drei Experimenten (3-11 Experimente). Die Fehlerwerte entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Empfindlichkeitsunterschiede der PUFA-Inhibition in Kv-Kanälen

Die inhibierende Wirkung von PUFA auf Kv-Kanäle ist seit langem bekannt. Abbildung 4.1 zeigt die Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen von Arachidonsäure (AA) auf den Shaker- und Kv3.1-Kanal. Die Messungen wurden in einer 120mM Kaliumchloridlösung intra- sowie extrazellulär durchgeführt und AA an exzidierte „inside-out“ Patche gespült. Oliver et al konnten bereits zeigen, dass die Applikation von  $1\mu\text{M}$  AA ausreichend war, um die Kv3.1-Kanäle nahezu vollständig zu inhibieren (Oliver et al., 2004). Sowohl die Shakerkanäle als auch die Kv2.1-Kanäle (keine Abb.) hingegen reagierten wesentlich unempfindlicher auf AA und waren erst bei einer Konzentration von  $50\mu\text{M}$  AA vollständig inhibiert. Dies zeigt, dass sich Kv-Kanäle deutlich in ihrer AA-Empfindlichkeit unterscheiden.

Interessanterweise erfolgt in Anwesenheit der Arachidonsäure nach Depolarisation der Membran zunächst die Aktivierung der Kv-Kanäle. Dies impliziert, dass die geschlossenen Kanäle nicht durch Arachidonsäure inhibiert sind. Sobald die ungesättigte Fettsäure jedoch gebunden hat, inhibiert der Shaker-Kanal. Der Einwasch bis zum Erreichen des „steady states“ der Inhibitor nach repetitiver Aktivierung des Kanals ist, wie Oliver et al., 2004 bereits am Kv3.1-Kanal zeigen konnten (Abschnitt 1.9.1), konzentrationsabhängig und nimmt bei einer Konzentration von  $10\mu\text{M}$  AA ca. 30s in Anspruch. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass erst nach Aufsättigung der Membran genügend freie AA zur Verfügung steht, um am Kanal zu binden.

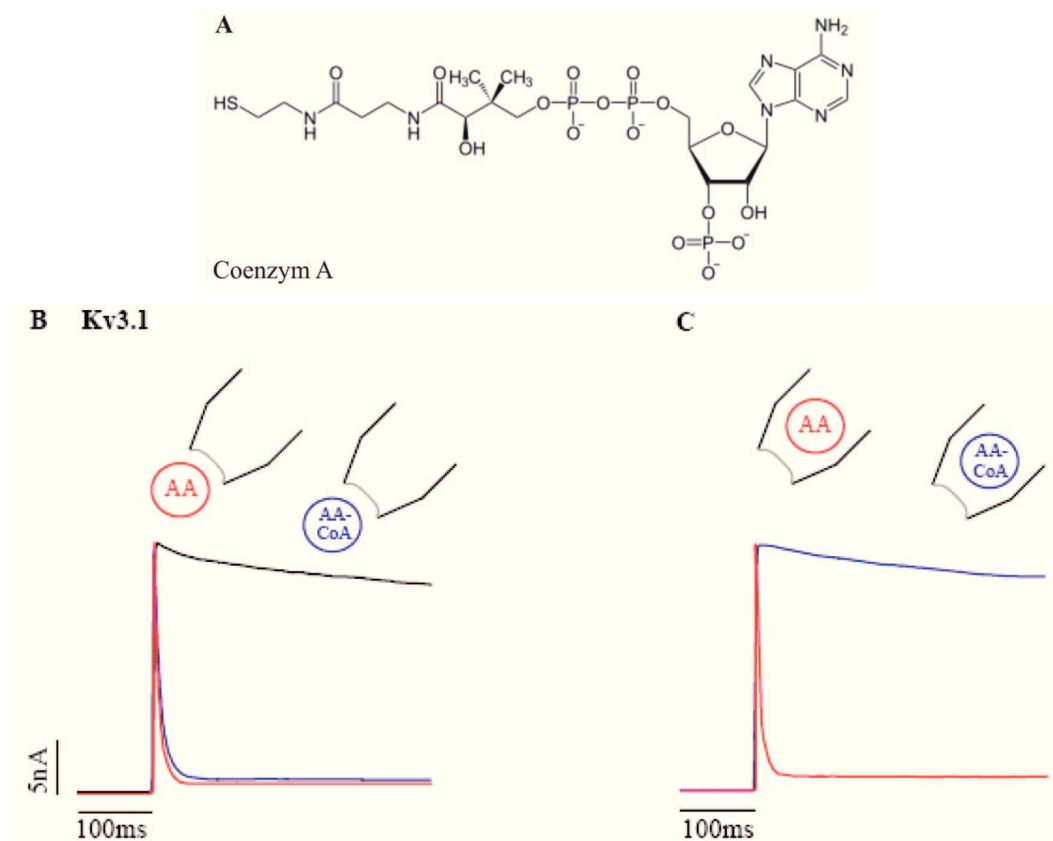


**Abbildung 4.1: Wirkung der Arachidonsäure auf verschiedene Kv-Kanäle in „inside-out“ Patchen in *Xenopus laevis* Oocyten.**

**A** Inhibition des Shaker-Kanals und **B** des Kv3.1-Kanals durch intrazelluläre Applikation verschiedener AA-Konzentrationen. Die Messung wurde an jeweils einem Patch durchgeführt. Zur Aktivierung der Kanäle erfolgte ein Spannungssprung (400ms) von -80mV auf +40mV bei symmetrischen Kaliumverhältnissen intra- und extrazellulär von 120mM KCl-Lösung.

## 4.2 PUFA wirken von der intrazellulären Seite der Zellmembran

Um den Wirkmechanismus der PUFA an Kv-Kanälen besser zu verstehen, wurde untersucht, ob PUFA von intra- und/oder extrazellulär am Kv-Kanal binden. Sowohl eine intra- als auch extrazelluläre Bindungsstelle wird in der Literatur diskutiert (Honore et al., 1994; Villaroel and Schwarz, 1996). Oliver et al. zeigten hingegen, dass die Arachidonsäure von beiden Seiten appliziert Kv3.1-Kanäle inhibiert (Oliver et al., 2004). Diese Ergebnisse konnten bestätigt werden. Hierzu wurden  $10\mu\text{M}$  AA von intrazellulär und  $20\mu\text{M}$  über die Pipettenlösung auf Kv3.1-Kanäle appliziert. Die Inhibition war von beiden Seiten gleichermaßen potent (Abb.4.2B+C). Da die AA selbst membranpermabel ist, wurde Arachidonoyl-CoA (AA-CoA) verwendet. Das AA-CoA kann die Lipiddoppelschicht aufgrund der mehrfach negativ geladenen Kopfgruppe, dem Coenzym A (Abb.4.2A), nicht passieren und durchspannt somit nach Applikation jeweils die innere oder äußere Schicht der Membran. In den Experimenten mit  $10\mu\text{M}$  intrazellulärem AA-CoA wurden die Kv3.1-Kanäle potent inhibiert. Nach extrazellulärer Applikation von  $20\mu\text{M}$  AA-CoA hingegen konnte keinerlei Inhibition erzeugt werden, was eine intrazelluläre Interaktionsstelle der AA an Kv-Kanälen vermuten lässt (Abb.4.2B+C).

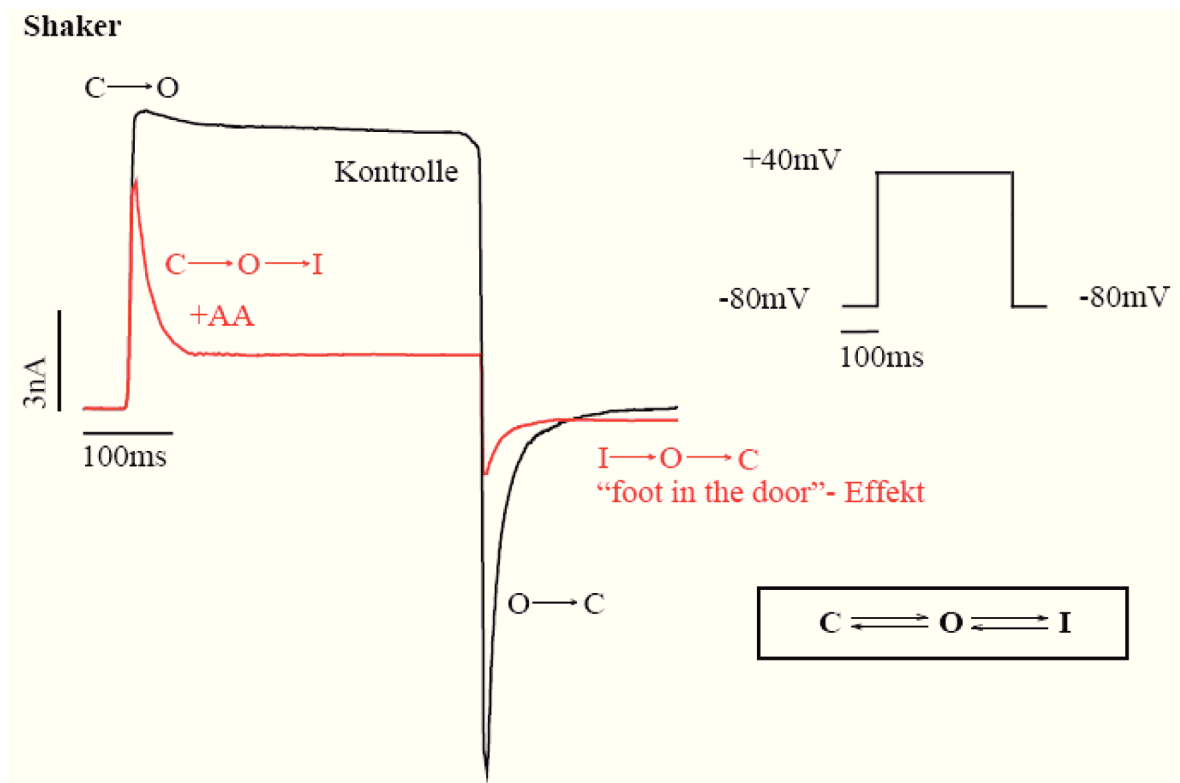


**Abbildung 4.2: Wirkung der Arachidonsäure und Arachidonoyl-CoA nach intra- und extrazellulärer Applikation auf den Kv3.1-Kanal.**

**A** Strukturformel Coenzym A. **B** Inhibition des Kv3.1-Kanals nach intrazellulärer Applikation von jeweils  $10\mu\text{M}$  AA und AA-CoA auf ein „inside-out“ Patch. Die Inhibition erfolgte bei beiden Substanzen schnell und vollständig. **C** Extrazelluläre Applikation von jeweils  $20\mu\text{M}$  beider Substanzen über die Pipettenlösung zeigt, dass der Kv3.1-Kanal nur durch die membranpermeable AA inhibiert werden konnte. Zur Aktivierung der Kanäle erfolgte ein Spannungssprung (400ms) von -80mV auf +40mV bei symmetrischen Kaliumverhältnissen intra- und extrazellulär von 120mM KCl-Lösung.

## 4.3 Beobachtung des „foot in the door“ Phänomens bei PUFA-Inhibition von Kv-Kanälen

Das „foot in the door“ Phänomen basiert auf der Beobachtung, dass das „activation gate“, welches im Bereich des terminalen S6-Segmentes in der Nähe der PXP-Sequenz (Long et al., 2005b) vermutet wird, nach Bindung eines „open-channel“ Blockers (u.a. Tetraethylammonium) in der Pore nicht mehr schließen kann. Da nur die nicht blockierten Kv-Kanäle in einem Makropatch deaktivieren können, ist die Deaktivierung („tail current“) dementsprechend verlangsamt. Dieser Effekt wurde zum ersten Mal durch Armstrong im Jahr 1971 beschrieben. Nun soll überprüft werden, ob auch die PUFA-Inhibition eine verlangsamte Deaktivierung zeigt. Dazu wurde in An- und Abwesenheit von  $10\mu\text{M}$  AA in einer symmetrischen  $120\text{mM}$  KCl-Lösung ein Spannungssprung von  $-80\text{mV}$  zu  $+40\text{mV}$  durchgeführt (Abb.4.3). In der Kontrolllösung reagieren die Shaker-Kanäle mit einer schnellen persistierenden Aktivierung ( $\text{C}\rightarrow\text{O}$ ) und inhibieren nach Applikation von  $10\mu\text{M}$  AA ( $\text{C}\rightarrow\text{O}\rightarrow\text{I}$ ). Die Repolarisation ( $+40\text{mV}$  zu  $-80\text{mV}$ ) der Membran führt in der Kontrolllösung zum schnellen Schließen der Shaker-Kanäle ( $\text{O}\rightarrow\text{C}$ ). In Anwesenheit von AA ist die Deaktivierungskurve verlangsamt, was nach Superposition beider Kurven am „cross over“ sichtbar wird (Abb.4.3). Dieses Ergebnis könnte bedeuten, dass Arachidonsäure in der Pore bindet und dadurch den Verschluss des „activation gates“ verhindert. Dies würde für einen Wirkmechanismus der PUFA im Sinne eines „klassischen“ „open-channel“ Blockers sprechen (Yellen, 1998). Ob es sich tatsächlich um einen durch AA ausgelösten „klassischen“ „open-channel“ Block oder um einen allosterischen Mechanismus (am Selektivitätsfilter) handelt, welcher die Kv-Kanäle inhibiert, soll in den folgenden Abschnitten erarbeitet werden.



**Abbildung 4.3: „foot in the door“ Effekt nach PUFA-Inhibition am Shaker-Kanal.** Aktivierungs- (-80mV zu +40mV für 400ms) und Deaktivierungskurve (+40mV zu -80mV für 100ms) der Shaker-Kanäle in An- und Abwesenheit von AA. Nach Applikation von 10 $\mu$ M AA werden die Shaker-Kanäle zunächst aktiviert, inhibieren jedoch sobald die Fettsäure gebunden hat. Die Deaktivierung erfolgt langsamer als in der Kontrolllösung, was an dem „cross over“ beider Deaktivierungskurven sichtbar wird. Die Experimente wurden in symmetrischen KCl-Lösung von jeweils 120mM durchgeführt.

## 4.4 Wirkung von TEA und seiner Derivate auf Kv-Kanäle

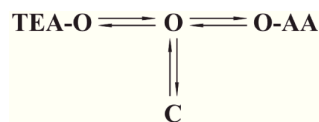
### 4.4.1 Abschwächung der PUFA-Inhibition durch intrazelluläres TEA

Eine weitere Möglichkeit, um zu testen, ob es sich bei der PUFA-Inhibition tatsächlich um eine „open-channel“ Blockade handelt, ist es die Wirkung eines bekannten „open-channel“ Blockers auf die PUFA-Inhibition zu untersuchen. Mit diesem Ziel wurde

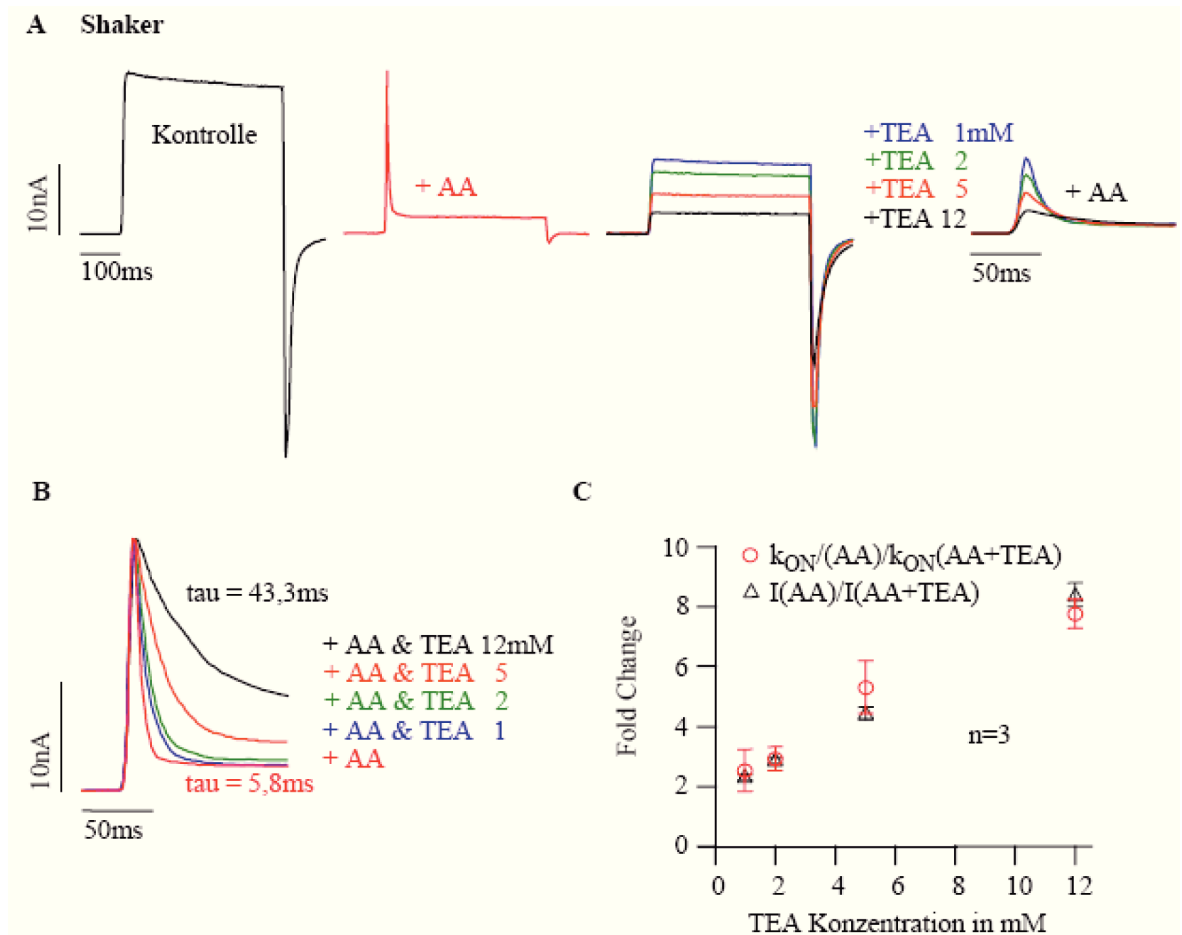


Tetraethylammonium (TEA) (Abb.1.8A) ausgewählt, welches ein etablierter „open-channel“ Blocker an Kv-Kanälen ist. TEA interagiert mit der Aminosäure T441 im Bereich der P-Schleife des Shaker-Kanals (Choi et al., 1993) und blockiert somit die Leitfähigkeit für Kaliumionen. Die folgenden Experimente dazu wurden sowohl am Shaker- als auch am Kv2.1-Kanal durchgeführt.

Die Shaker- und Kv2.1-Kanäle wurden mit verschiedenen TEA-Konzentrationen (1, 2, 5 und 12mM) fraktionell blockiert und unter diesen Bedingungen die AA-Inhibition untersucht. Auffällig war, dass die AA-Inhibition mit zunehmender TEA-Konzentration immer stärker abgeschwächt wurde. Um die Zeitkonstanten der Inhibierung für jede einzelne Messung bestimmen zu können, wurde der Zeitverlauf der Inhibition monoexponentiell gefittet und die jeweilige Zeitkonstante bestimmt. Unter Kontrollbedingungen betrug die Zeitkonstante ( $\tau_{in}$ ) der durch AA ( $50\mu\text{M}$ ) hervorgerufenen Inhibition am Shaker-Kanal  $5,2\text{ms} \pm 0,8\text{ms}$  ( $n=3$ ). Die Blockade der Kv-Kanäle durch ansteigende TEA-Konzentrationen nahm von  $54,3\% \pm 1,5\%$  auf bis  $88\% \pm 1\%$  zu, während das  $\tau_{in}$  der AA-Inhibition von  $12,2\text{ms} \pm 3,2\text{ms}$  auf  $39,8\text{ms} \pm 4,3\text{ms}$  (Abb.4.4A+B) verlangsamt war. Die gleichen Experimente wurden auch am Kv2.1-Kanal ( $n=1$ ) durchgeführt. Hierbei konnten durch 1mM TEA 66% und durch 12mM 90% der Kanäle blockiert werden. Nach dem Einwasch von  $50\mu\text{M}$  AA allein betrug das  $\tau_{in}$  7,8ms (Abb.4.5A) und in Anwesenheit von 1mM TEA 20,8ms bzw. 12mM TEA 47ms. Die Änderung der AA-Inhibitionsrate verhält sich also proportional zum fraktionellen TEA-Block des Auswärtsstromes am Shaker- und Kv2.1-Kanal (Abb.4.4C und 4.5B). D.h. im Falle einer Blockade von 50% der Kv-Kanäle durch TEA ist die durch PUFA induzierte Inhibition (O-AA) nur halb so schnell, da lediglich die Kv-Kanäle im offenen Zustand (O) durch PUFA inhibiert werden können. Ein durch TEA blockierter Kv-Kanal (TEA-O) hingegen kann nicht durch PUFA inhibiert werden. Zur Verdeutlichung folgendes Reaktionsschema:



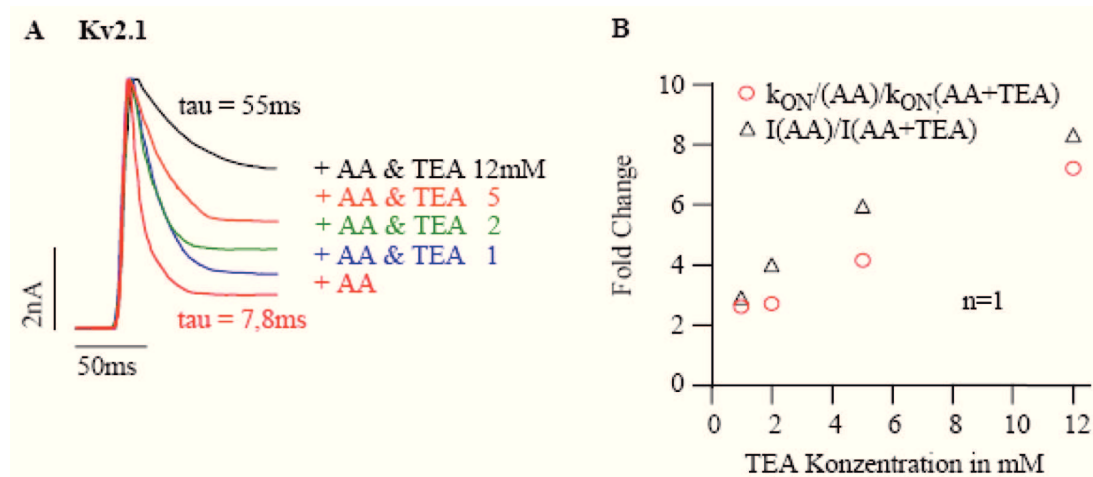
Diese Ergebnisse implizieren eine Konkurrenz beider Substanzen in der Pore, sodass die Hypothese einer „open-channel“ Blockade durch PUFA weiterhin gestützt wird. (Wie weiter unten ersichtlich, ist diese Schlussfolgerung nicht korrekt.)



**Abbildung 4.4: Verlangsamung der PUFA-Inhibition nach intrazellulärer TEA-Applikation am Shaker-Kanal.**

**A** Zu Beginn des Experimentes wurden  $50\mu\text{M}$  AA auf ein „inside-out“ Patch appliziert. Die Inhibition erfolgte schnell und vollständig. Nach dem Auswasch der AA wurde der Auswärtsstrom mittels verschiedener intrazellulärer TEA-Konzentrationen unterschiedlich stark blockiert (mit 1mM TEA 54%, 2mM TEA 62%, 5mM TEA 75% und 12mM TEA 87%) und anschließend zusätzlich  $50\mu\text{M}$  AA appliziert. **B** Die Abschwächung der PUFA-Inhibition nach Normalisierung der Restströme auf die initiale Stromgröße in Abhängigkeit der Rate TEA-blockierter Kanäle wird so besonders deutlich. Das  $\tau_{in}$  nach Applikation von  $50\mu\text{M}$  AA allein betrug 5,8ms und in Anwesenheit von 1mM TEA 9,3ms, von 2mM TEA 12,6ms, von 5mM TEA 23,2ms und von 12mM TEA 43,3ms.

**C** Änderungen der Größe des Auswärtsstroms nach TEA-Block ( $\Delta$ ) und der „on-rate“ ( $k_{on}$ ) des TEA-Blockes ( $\circ$ ) in Abhängigkeit der applizierten TEA-Konzentration in mM am Shaker-Kanal verhalten sich proportional.  $k_{on}$  wurde nach folgender Gleichung berechnet:  $k_{on} = 1/t / (1 + I_{unbl}/I_{block})$ , wobei  $(1/t)$  die Zeitkonstante nach monoexponentieller Anpassung jeder einzelnen Messung darstellt und  $I_{unbl}/I_{block}$  das Verhältnis der nicht TEA-blockierten Kanäle zu den TEA-blockierten Kanälen zeigt (Choi et al., 1991). Zur Aktivierung der Kanäle erfolgte ein Spannungssprung (400ms) von -80mV auf +40mV bei symmetrischen Kaliumverhältnissen intra- und extrazellulär von 120mM KCl-Lösung.



**Abbildung 4.5: Verlangsamung der PUFA-Inhibition nach intrazellulärer TEA-Applikation am Kv2.1-Kanal.**

**A** Abschwächung der PUFA-Inhibition in Abhängigkeit der Rate TEA-blockierter Kanäle (mit 1mM TEA 66%, 2mM TEA 75%, 5mM TEA 83% und 12mM TEA 88%) nach Normalisierung der Restströme auf die initiale Stromgröße. Das  $\tau_{in}$  nach Applikation von  $50\mu\text{M}$  AA allein betrug 7,8ms und in Anwesenheit von 1 und 2mM TEA 20,8ms, von 5mM TEA 32ms und von 12mM TEA 55ms. **B** Änderungen der Größe des Auswärtsstroms nach TEA-Block ( $\Delta$ ) und der „on-rate“ ( $k_{on}$ ) des TEA-Blockes ( $\circ$ ) in Abhängigkeit der applizierten TEA-Konzentration in mM am Kv2.1-Kanal verhalten sich proportional (weitere Erläuterungen siehe Abb.4.4).

#### 4.4.2 Wirkung der TEA-Derivate auf die PUFA-Inhibition

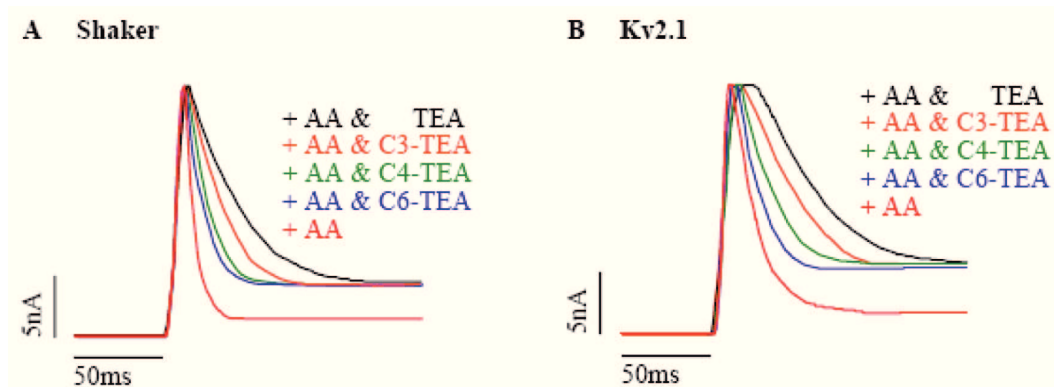
Armstrong konnte bereits im Jahr 1971 zeigen, dass langkettige Alkyl-Derivate des TEAs Kv-Kanäle potent blockieren. Dabei interagieren sie mit zunehmender Länge der hydrophoben Alkylkette stärker mit den Aminosäuren der S6-Segmente, wodurch die Kopfgruppe den Kontakt zur Stelle T441 in der Porenregion des Shaker-Kanals verliert (Choi et al., 1993). Dieses Wissen nutzten Baukrowitz und Yellen bei der genaueren Charakterisierung der Verlangsamung der „C-type“ Inaktivierung durch TEA aus. Sie konnten zeigen, dass TEA die „C-type“ Inaktivierung, welche durch einen Porenkollaps zum Verlust der Leitfähigkeit für Kaliumionen führt, verhindert (Baukrowitz and Yellen, 1996). Dafür ist ein enger Kontakt der Kopfgruppe Triethylammonium des TEA zur Aminosäure T441 notwendig. Je länger die Alkylkette der TEA-Derivate jedoch wurde, desto stärker interagierten diese mit den Aminosäuren der S6-Segmente und

umso geringer war der Effekt auf die „C-type“ Inaktivierung.

In dieser Arbeit soll auf Grundlage dieser Kenntnisse untersucht werden, inwieweit die TEA-Derivate in Abhängigkeit von der Alkylkettenlänge die PUFA-Inhibition beeinflussen. Für die Experimente waren nur das kurzkettigere Propyl-, Butyl- und Hexyltriethylammoniumbromid (C3, C4- und C6-TEA) geeignet, da durch Octyl- oder Decyltriethylammoniumbromid (C8- oder C10-TEA) kein schneller Amplitudenblock, sondern eine langsamere zeitabhängige Blockierung induziert wird (Choi et al., 1993), welche sich bei gleichzeitiger Applikation nicht von der PUFA-Inhibition trennen lässt. Die Konzentrationen des TEAs (5mM) sowie der TEA-Derivate (C3-TEA 8mM, C4-TEA 5mM und C6-TEA 1mM) wurden so gewählt, dass ungefähr 80% der Shaker-Kanäle (83% +/- 2,5%) blockiert waren. Die Zeitkonstante der Inhibition ( $\tau_{in}$ ) nach Einwasch von 50 $\mu$ M AA allein betrug 7ms und in Anwesenheit von 5mM TEA 35ms. Nach Blockade der Shaker-Kanäle durch C3-TEA ( $\tau_{in}$ =22ms) war die Kinetik der PUFA-Inhibition weniger stark verlangsamt und durch C4-TEA ( $\tau_{in}$ =15ms) und C6-TEA ( $\tau_{in}$ =11ms) sogar nahezu gleich zum Kontrollexperiment ohne TEA (Abb.4.6A).

Da die Kv2.1-Kanäle wesentlich empfindlicher auf die längerkettigen TEA-Derivate reagierten, war eine Anpassung der Konzentrationen - C3-TEA 7mM, C4-TEA 3,75mM und C6-TEA 0,75mM - notwendig, wodurch 87% +/- 1,6% der Kv2.1-Kanäle blockierten. Die Kv2.1-Kanäle wurden zu Beginn des Experiments mit 50 $\mu$ M AA inhibiert. Die Zeitkonstante der Inhibition betrug dabei 13ms und konnte nach der „open-channel“ Blockade durch TEA auf ein  $\tau_{in}$  von 42ms verlangsamt werden. Das C3-TEA ( $\tau_{in}$ =33ms) schwächte die PUFA-Inhibition nur noch moderat ab, wohingegen das C4-TEA ( $\tau_{in}$ =24ms) und C6-TEA ( $\tau_{in}$ =20ms) diese nicht mehr beeinflussten (Abb.4.6B).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Abschwächung der PUFA-Inhibition am Shaker- und Kv2.1-Kanal nur möglich ist, wenn die TEA-Kopfgruppe und nicht die hydrophobe Alkylkette die Bindung dominiert.



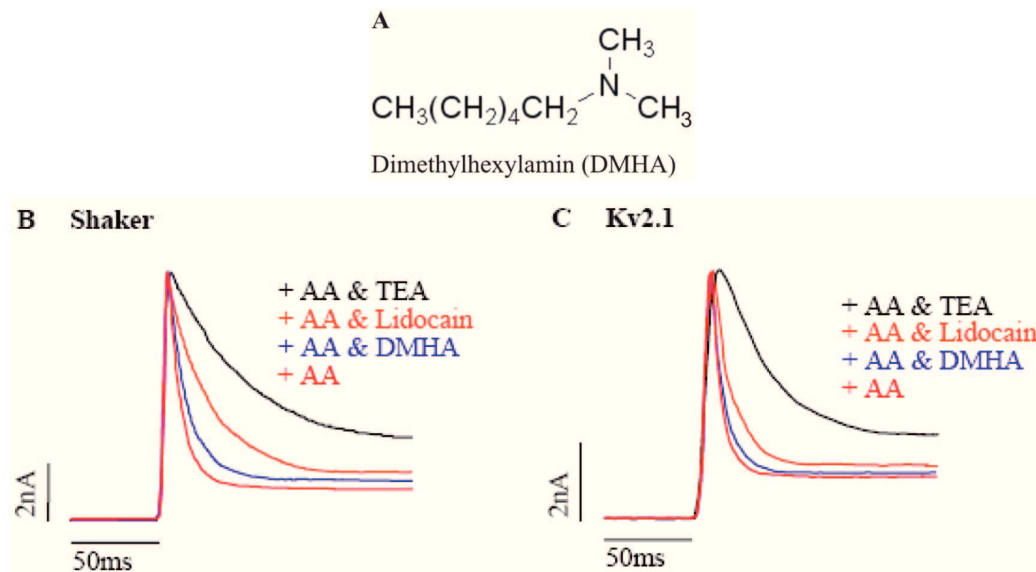
**Abbildung 4.6: Wirkung von Alkyl-Derivaten des TEAs auf die PUFA-Inhibition am Shaker- und Kv2.1-Kanal.**

Abschwächung der PUFA-Inhibition nach Applikation von  $50\mu\text{M}$  Arachidonsäure ist in Anwesenheit längerkettiger Alkyl-Derivate des TEA aufgehoben. Während das C3-TEA die Inhibition noch moderat abschwächt, ist diese nach Applikation des C4- und C6-TEAs sowohl an den **A** Shaker- als auch **B** Kv2.1-Kanälen aufgehoben. Die Restströme sind auf die initiale Stromgröße normalisiert. Auffällig ist bei beiden Kv-Kanälen, dass der „steady state“ der PUFA-Inhibition in Anwesenheit der TEA-Derivate nicht erreicht wird. Die Messungen wurden jeweils an einem Patch durchgeführt. Zur Aktivierung der Kanäle erfolgte ein Spannungssprung (400ms) von  $-80\text{mV}$  auf  $+40\text{mV}$  bei symmetrischen Kaliumverhältnissen intra- und extrazellulär von  $120\text{mM}$  KCl-Lösung.

Um die Validität dieser Korrelation zu überprüfen, sollen außer der TEA-Derivate noch zwei weitere Substanzen, welche sich hinsichtlich ihrer Kopfgruppe unterscheiden, getestet werden. Zum einen handelt es sich um das Lidocain N-ethyl bromid (QX314) (Abb.1.8) mit gleicher Kopfgruppe wie das TEA und zum anderen um das Dimethylhexylamin (DMHA) (Abb.4.7A) mit einer Dimethylammoniumgruppe. Um in etwa 80% der Shaker-Kanäle zu blockieren, wurden  $500\mu\text{M}$  QX314 und  $12\text{mM}$  DMHA verwendet ( $78,3\% \pm 2,9\%$ ). Im Kontrollexperiment mit  $50\mu\text{M}$  AA konnte ein  $\tau_{in}$  von  $11,7\text{ms}$  und in Gegenwart von  $5\text{mM}$  TEA ein  $\tau_{in}$  von  $50\text{ms}$  gemessen werden. Das QX314 ( $\tau_{in}=25\text{ms}$ ) verlangsamte ähnlich dem C3-TEA die PUFA-Inhibition weniger stark. Die Substanz DMHA ( $\tau_{in}=16,4\text{ms}$ ) hatte hingegen keinerlei Wirkung auf die Kinetik der AA-Inhibition (Abb.4.7B).

Für die Experimente an den Kv2.1-Kanälen wurden  $500\mu\text{M}$  QX314 und  $10\text{mM}$  DMHA verwendet, was durchschnittlich  $81\% \pm 2,3\%$  der Kanäle blockierte. In Anwesenheit von AA allein betrug das  $\tau_{in}$   $9\text{ms}$  und in Gegenwart von  $5\text{mM}$  TEA  $30\text{ms}$ . Die

Substanz QX314 ( $\tau_{in}=18\text{ms}$ ) schwächte die PUFA-Inhibition durch AA nur moderat ab und das DMHA ( $\tau_{in}=9\text{ms}$ ) hatte keinerlei Einfluss (Abb.4.7C).



**Abbildung 4.7: Wirkung von QX-314 und DMHA auf die PUFA-Inhibition am Shaker- und Kv2.1-Kanal.**

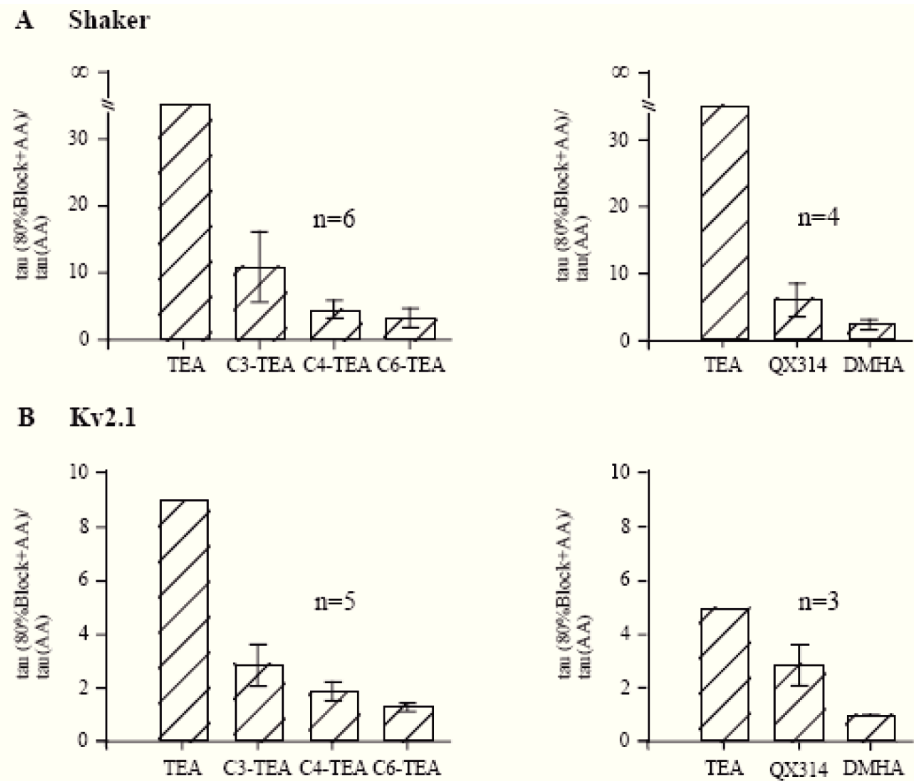
**A** Strukturformel von DMHA (Dimethylhexylamin). Abschwächung der PUFA-Inhibition nach Applikation von  $50\mu\text{M}$  AA durch QX314 moderat und durch DMHA gänzlich am **B** Shaker- und **C** Kv2.1-Kanal aufgehoben. Beide Substanzen v.a. DMHA nähern sich dabei dem „steady state“ der durch AA induzierten Inhibition im Gegensatz zu den TEA-Derivaten stark an. Die Restströme sind auf die initiale Stromgröße normalisiert. Die Messungen wurden teilweise auch an mehreren Patchen durchgeführt. Zur Aktivierung der Kanäle erfolgte ein Spannungssprung (400ms) von  $-80\text{mV}$  auf  $+40\text{mV}$  bei symmetrischen Kaliumverhältnissen intra- und extrazellulär von  $120\text{mM}$  KCl-Lösung.

Bemerkenswert ist, dass der „steady state“ der AA-Inhibition in Gegenwart der TEA-Derivate (C4- und C6-TEA) nicht erreicht wird, obwohl die Zeitkonstante der Inhibition unverändert ist (Abb.4.6). Eine wahrscheinliche Erklärung dafür ist, dass die TEA-Derivate und AA gleichzeitig in der Pore binden, dadurch die „off-rate“ (Freisetzungsrate) von AA erhöhen und somit den „steady state“ der AA-Inhibition entsprechend verändern. Es ist wichtig hier hervorzuheben, dass sich die Zeitkonstante der Inhibition aus  $\tau_{in}=(k_{on}+k_{off})^{-1}$  ergibt. Insofern bewirken die TEA-Derivate auch eine geringfügige Abnahme der Bindungsrate ( $k_{on}$ ), da sich der „steady state“ der Inhibition von ca. 90% auf 70% verschiebt. Die Wirkung auf die Anbindungsrate ( $k_{off}$ ) muss hingegen fiel

deutlicher sein, sonst könnte sich der „steady state“ nicht dementsprechend verschoben haben. Weitere Untersuchungen der  $k_{off}$  waren jedoch nicht möglich, da der Auswasch der AA aus dem Patch nur sehr langsam erfolgt und somit eine direkte Bestimmung der  $k_{off}$  verhindert.

Zusammenfassend kann die Aussage getroffen werden, dass die TEA-blockierten Shaker- und Kv2.1-Kanäle, wie im Balkendiagramm in Abbildung 4.8 dargestellt, durch Arachidonsäure nicht mehr inhibiert werden können. Jedoch sobald die Kopfgruppe modifiziert oder die hydrophobe Alkylkette des TEAs länger ist, ist die Inhibition durch PUFA in Anwesenheit des Blockers möglich. Anhand dieser Daten wird der Mechanismus einer „open-channel“ Blockade durch PUFA unwahrscheinlicher. Viel nahe liegender ist, dass die PUFA mit Aminosäuren der S6-Segmente interagieren und einen allosterischen Mechanismus, vermutlich im Selektivitätsfilter, auslösen, was den Kollaps der Pore zur Folge hat. In Anwesenheit von TEA wird der Selektivitätsfilter vermutlich stabilisiert und somit der Inhibierungsmechanismus durch PUFA verhindert.

PUFA führen also, ähnlich der bereits dargestellten intrinsischen Inaktivierungsmechanismen „C-type“- und „N-type“ Inaktivierung, zu strukturellen Veränderungen im Kanalprotein, was den Verlust der Kaliumleitfähigkeit zur Folge hat. Die Inhibition durch PUFA kann daher als ein weiterer Inaktivierungsmechanismus von Kv-Kanälen angesehen werden. Aus diesem Grund wird in den folgenden Abschnitten nicht der Begriff Inhibitionsmechanismus sondern Inaktivierungsmechanismus durch PUFA verwendet.



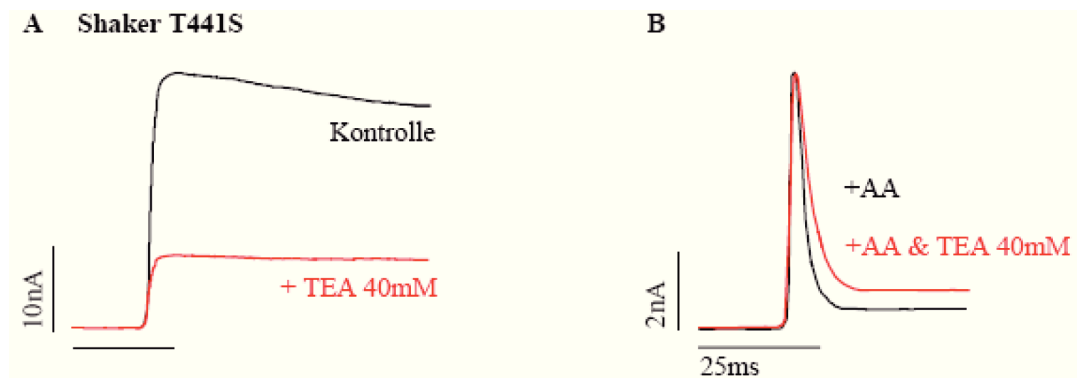
**Abbildung 4.8:** **A** TEA-blockierte Shaker-Kanäle ( $\tau(80\%Block+AA)$ ) können durch PUFA nicht mehr inhibiert werden, d.h. die Verlangsamung der PUFA-Inhibition  $\tau(80\%Block+AA)/\tau(AA)$  geht gegen unendlich. Mittels C3-TEA bzw. QX314 blockierte Kanäle inaktivieren nach zusätzlicher Applikation von PUFA um das 11,3fache  $\pm$  5,1 bzw. 5,9fache  $\pm$  0,17 langsamer. Bei Blockade durch die längerkettigeren Derivate C4- und C6-TEA (4,7fach  $\pm$  1,3 und 3,4fach  $\pm$  1,4) oder DMHA (2,3fach  $\pm$  0,44) ist die Abschwächung der PUFA-Inhibition nahezu aufgehoben. Die Berechnung  $\tau(80\%Block+AA)$  erfolgte nach der Gleichung:  $1/\tau(\text{gesamt}) = A \cdot 1/\tau(AA) + B \cdot 1/\tau(80\%Block+AA)$ , wobei das  $\tau(\text{gesamt})$  die durch TEA bzw. TEA-Derivate blockierten Kanäle (ca.80%) und die geöffneten Kanäle (ca.20%), welche durch Arachidonsäure inhibierbar sind, berücksichtigt. **A** bzw. **B** gibt die Rate der geöffneten bzw. blockierten Kanäle an. **B** Verlangsamung der PUFA-Inhibition  $\tau(80\%Block+AA)/\tau(AA)$  um ein Vielfaches (Schwankungsbreite 3 bis 20fach, daher keine Angabe der Standardabweichung) am Kv2.1-Kanal. Mittels C3-TEA bzw. QX314 blockierte Kanäle inhibieren nach zusätzlicher Applikation von PUFA um das 2,9fache  $\pm$  0,94 bzw. 2,9fache  $\pm$  0,75 langsamer. Bei Blockade durch die längerkettigeren Derivate C4- und C6-TEA (1,9fach  $\pm$  0,34 bzw. 1,3fach  $\pm$  0,17) sowie DMHA (1fach  $\pm$  0,04) ist die Abschwächung der PUFA-Inhibition vollständig aufgehoben. Die Messungen wurden zum Teil an einem Patch oder auch an mehreren Patches durchgeführt. Zur Aktivierung der Kanäle erfolgte ein Spannungssprung (400ms) von -80mV auf +40mV bei symmetrischen Kaliumverhältnissen intra- und extrazellulär von 120mM KCl-Lösung.



#### 4.4.3 Mutation T441S am Shaker-Kanal hebt die Wirkung von intrazellulärem TEA auf die PUFA-Inaktivierung auf

Die Aminosäure Threonin an der Stelle 441 befindet sich unterhalb der intrazellulär zugewandten Seite des Selektivitätsfilters (Aminosäure 442-446) im Shaker-Kanal. Es ist bekannt, dass die Affinität des Shaker-Kanals gegenüber intrazellulär appliziertem TEA nach Punktmutation des Threonin zum Serin um etwa das 10fache herabgesetzt ist (Yellen et al., 1991). Im Weiteren hebt diese Punktmutante die Wirkung von TEA auf die „C-type“ Inaktivierung auf (Baukrowitz and Yellen, 1996). Im folgenden Experiment, welches in Zusammenarbeit mit Gunter Ehrlich, einem Mitglied der Arbeitsgruppe von Prof. Baukrowitz entstand, wurde die Wirkung der T441 Mutante auf die PUFA-Inaktivierung untersucht.

Im Kontrolllexperiment führen 20 $\mu$ M AA zu einer fast vollständigen Inaktivierung der Shaker-Kanäle mit einer Zeitkonstante von 5ms. Nach Applikation von 40mM TEA werden 76,7%  $\pm$  1,2% (n=3) der Kanäle blockiert (Abb.4.9A), wobei der Zeitverlauf der AA-Inaktivierung unverändert bleibt ( $\tau_{in}$ =5,6ms) (Abb.4.9B).



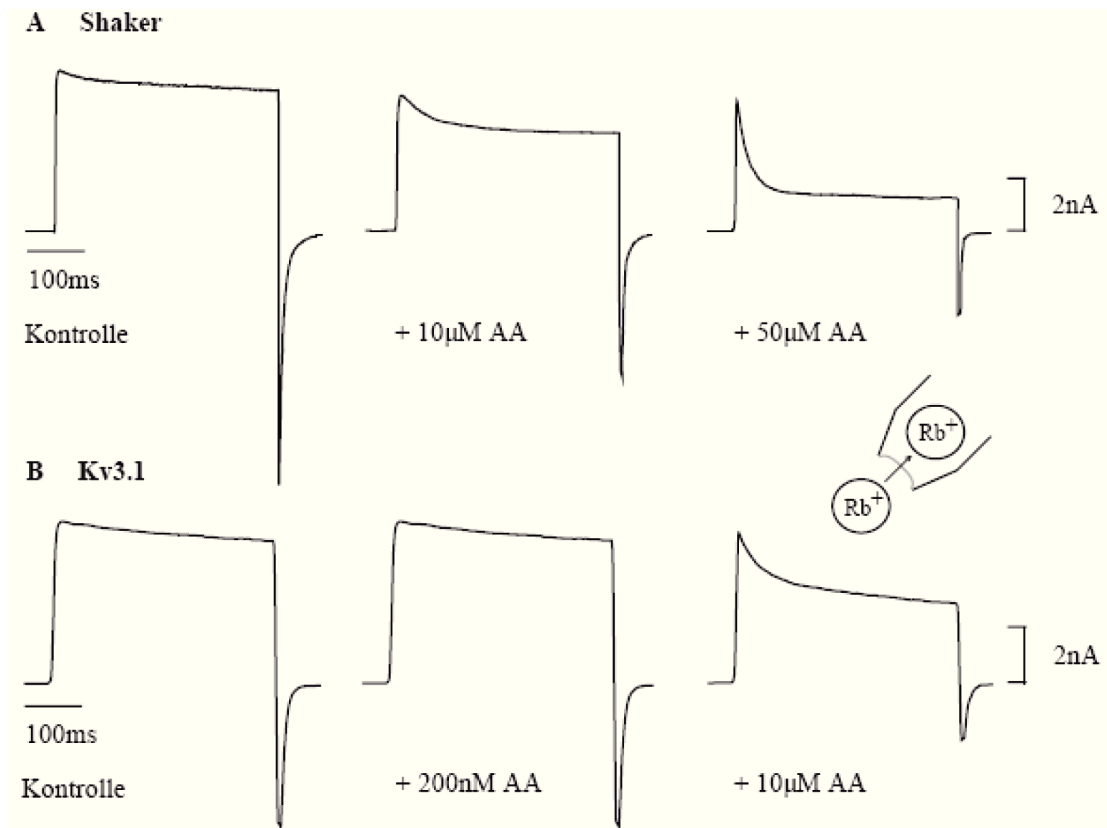
**Abbildung 4.9: Beeinflussung der PUFA-Inaktivierung in An- und Abwesenheit von intrazellulärem TEA am Shaker-Kanal T441S.**

**A** Partielle Blockade (76%) des Auswärtsstroms mittels 40mM intrazellulären TEAs. **B** Inaktivierung der Shaker-Kanäle mit 20 $\mu$ M AA in An- und Abwesenheit von 40mM intrazellulären TEAs. Die PUFA-Inaktivierung ist bei einem  $\tau_{in}$  von jeweils 5ms ohne TEA sowie 5,6ms mit TEA gleichermaßen potent. Die Messung wurde an einem Patch durchgeführt. Zur Aktivierung der Kanäle erfolgte ein Spannungssprung (300ms) von -80mV auf +40mV bei symmetrischen Kaliumverhältnissen intra- und extrazellulär von 120mM KCl-Lösung.

Vermutlich kann das TEA den Selektivitätsfilter der Punktmutante T441S des Shaker-Kanals nicht ausreichend stabilisieren, um den Porenkollaps nach Applikation von PUFA zu verhindern. Diese Ergebnisse unterstreichen die Annahme, dass TEA nicht durch Verdrängung von Arachidonsäure sondern durch Stabilisierung des Selektivitätsfilters die PUFA-Inaktivierung beeinflussen.

## **4.5 Wirkung von Rubidiumionen auf die Inhibition von Kv-Kanälen durch Arachidonsäure und „klassischen“ „open-channel“ Blockern**

Oliver et al. zeigte, dass die Inaktivierung der Kv-Kanäle durch PUFA sehr stark vom permeierenden Ion abhängig ist. Er berichtete, dass die Permeation von Rubidiumionen anstelle von Kaliumionen eine dramatische Reduktion der PUFA-Inaktivierung zur Folge hat (Oliver et al., 2004). Dieses Ergebnis konnte ich bestätigen. In der Abbildung 4.10 ist die Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen AA auf Shaker- und Kv3.1-Kanäle in einer 120mM Rubidiumchloridlösung dargestellt (im Vergleich siehe Abbildung 4.1). In beiden Fällen kommt es in der Rubidiumlösung unabhängig von der AA-Konzentration zu einer dramatischen Abnahme der AA-Inaktivierung.



**Abbildung 4.10: Rubidiumabhängigkeit der Arachidonsäure nach Applikation auf verschiedene Kv-Kanäle.**

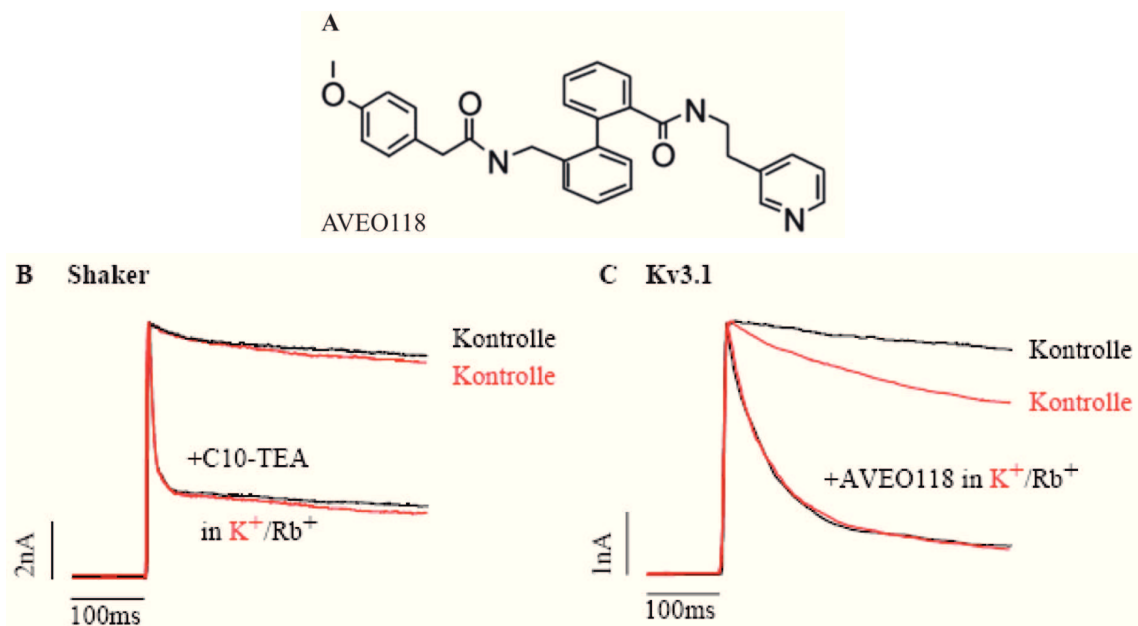
**A** Inaktivierung der Shaker- und **B** Kv3.1-Kanäle durch intrazelluläre Applikation verschiedener AA-Konzentrationen in einer 120mM Rubidiumchloridlösung (im Vergleich siehe Abb.4.1). Zur Aktivierung der Kanäle erfolgte ein Spannungssprung (400ms) von -80mV auf +40mV mit einer 120mM extrazellulären KCl-Lösung.

Im Folgenden wurde das gleiche Experiment für zwei „klassische“ „open channel“ Blocker, das C10-TEA und AVEO118, wiederholt.

Das C10-TEA ist ein sehr potenter Porenblocker des Shaker- und Kv2.1-Kanals, wobei die Kopfgruppe, das Triethylammonium, im Bereich der Porenregion bindet und die hydrophobe Alkylkette mit dem S6-Segment interagiert (Choi et al., 1993). Die Abbildung 4.11B zeigt die Wirkung von 5µM C10-TEA auf Shaker-Kanäle, welche nach einem 400ms Depolarisationspuls in einer 120mM KCl- bzw. RbCl-Lösung aktivieren. Interessanterweise konnte die Blockade durch Rubidiumionen weder verlangsamt noch in ihrem Ausmaß abgeschwächt werden.

Als zweiter Kv-Kanalblocker wurde AVEO118 (Abb.4.11A) (2'-{[2-(4-Methoxy-Phenyl)-

Acetylamino]-Methyl}-Biphenyl-2-Carbonsäure(2-Pyridin-3-yl-Ethyl)-amid verwendet. Dieser Blocker bindet am geöffneten Kv3.1-Kanal an einer hochkonservierten Aminosäuresequenz im S6-Segment (Decher, et al., 2006). Nach Applikation von 10  $\mu$ M AVEO118 inhibierten die Kv3.1-Kanäle ebenfalls unabhängig vom permeierenden Ion nach einem Depolarisationspuls (Abb.4.11C).



**Abbildung 4.11: Inhibition durch C10-TEA und AVEO118 sind nicht rubidium-abhängig.**

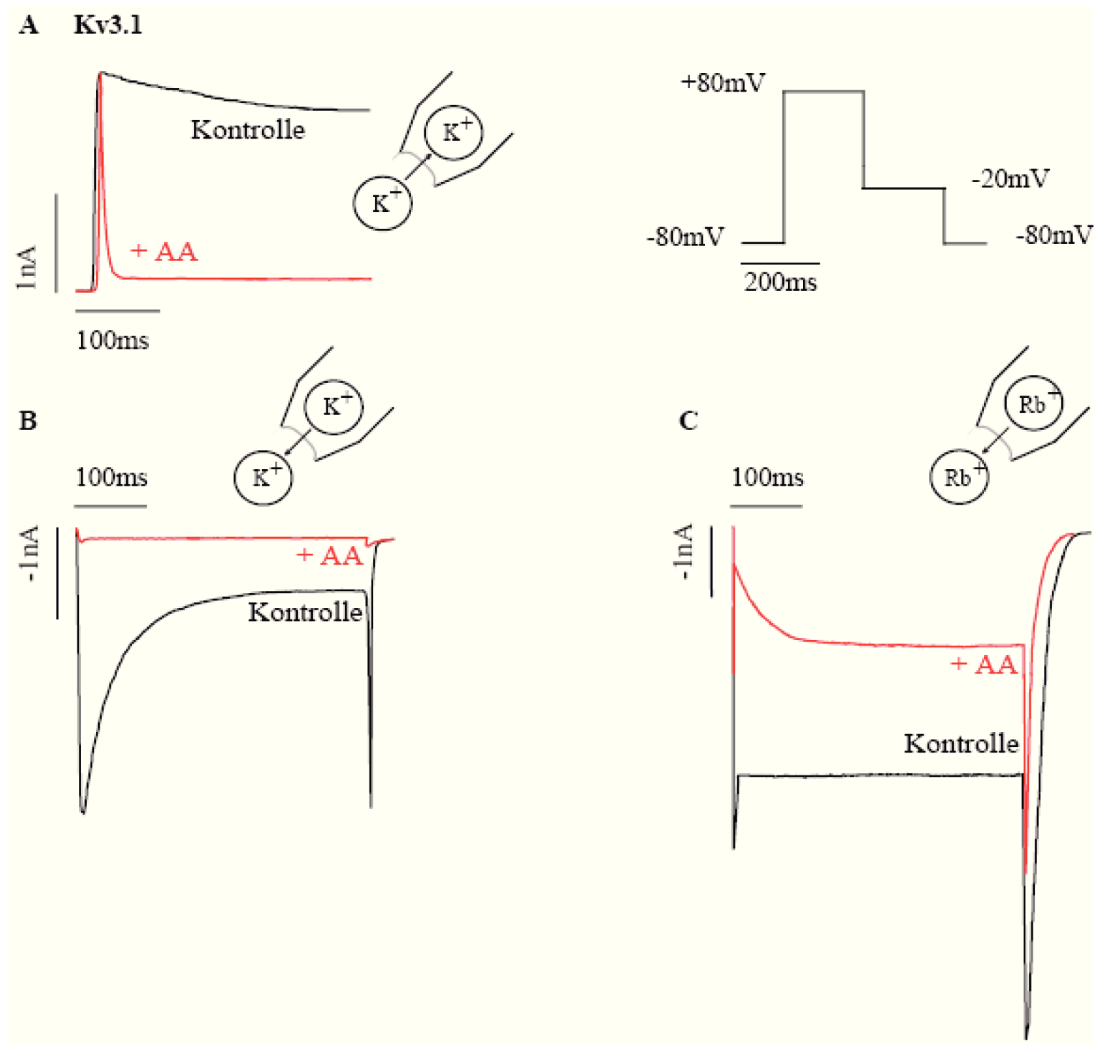
**A** Strukturformel AVEO118. Inaktivierung des **B** Shaker-Kanals durch Applikation von 5  $\mu$ M C10-TEA und **C** des Kv3.1-Kanals mittels 10  $\mu$ M AVEO118 sowohl mit 120mM KCl-Lösung als auch 120mM RbCl-Lösung. Die Inhibition konnte bei beiden Blockern durch Rubidiumionen nicht verlangsamt werden. Zur Aktivierung der Kanäle erfolgte ein Spannungssprung (400ms) von -80mV auf +40mV.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Permeation von Rubidiumionen keinen Einfluss auf die Wirkung von „open-channel“ Blockern hat. Die Wirkung von AA wird hingegen stark abgeschwächt. Dies impliziert, dass sich die Wirkmechanismen der „open-channel“ Blocker und der PUFA grundlegend unterscheiden. Es ist vorstellbar, dass PUFA durch Interaktionen mit Aminosäuren der S6-Segmente (Decher et al., 2010; Moreno-Galindo et al., 2010) über einen allosterischen Mechanismus einen Porenkollaps bedingen, welcher zum Teil durch Rubidiumionen verhindert werden kann.

### 4.5.1 Beteiligung des Selektivitätsfilters an der PUFA-Inaktivierung

Die obigen Ausführungen zeigen, dass ein von Rubidium getragener Auswärtsstrom die AA-Inaktivierung stark abschwächt. Um zu untersuchen, inwieweit ein Rubidium-Einwärtsstrom die AA-Inaktivierung beeinflusst, wurden folgende Bedingungen gewählt, die eine Aktivierung von Kv3.1-Kanälen ermöglichen und gleichzeitig einen Rubidium-Einwärtsstrom hervorrufen: intrazellulär 30mM Kaliumchloridlösung und extrazellulär 180mM Rubidiumchloridlösung. Ein Spannungssprung nach 80mV führt zu einem Kalium getragenen Auswärtsstrom und eine Repolarisation nach -20mV zu einem Rubidium getragenen Einwärtsstrom. Die Abbildung 4.12A zeigt, dass 10 $\mu$ M AA zu einer schnellen Inaktivierung des Kaliumauswärtsstroms führen. Nach Repolarisation bleiben die Kv3.1-Kanäle in Anwesenheit von Kalium in der Pore weiterhin inaktiviert (Abb.4.12B). In den Experimenten mit extrazellulärem Rubidium kommt es jedoch durch einen Spannungssprung nach -20mV zu einer teilweisen Aufhebung der AA-Inaktivierung (Abb.4.12C). Die Zeitkonstante betrug ca. 70ms.

Diese Experimente zeigen, dass die Ionenzusammensetzung der intra- und extrazellulären Lösung an sich keinen direkten Einfluss auf die PUFA-Inaktivierung haben. Vielmehr ist die Stromrichtung und damit die Ionenspezies, welche sich in der Pore (Selektivitätsfilter) befindet, entscheidend für die PUFA-Inaktivierung.



**Abbildung 4.12: Rubidiumabhängigkeit der Arachidonsäure-Inaktivierung am Kv3.1-Kanal ist von der Stromrichtung abhängig.**

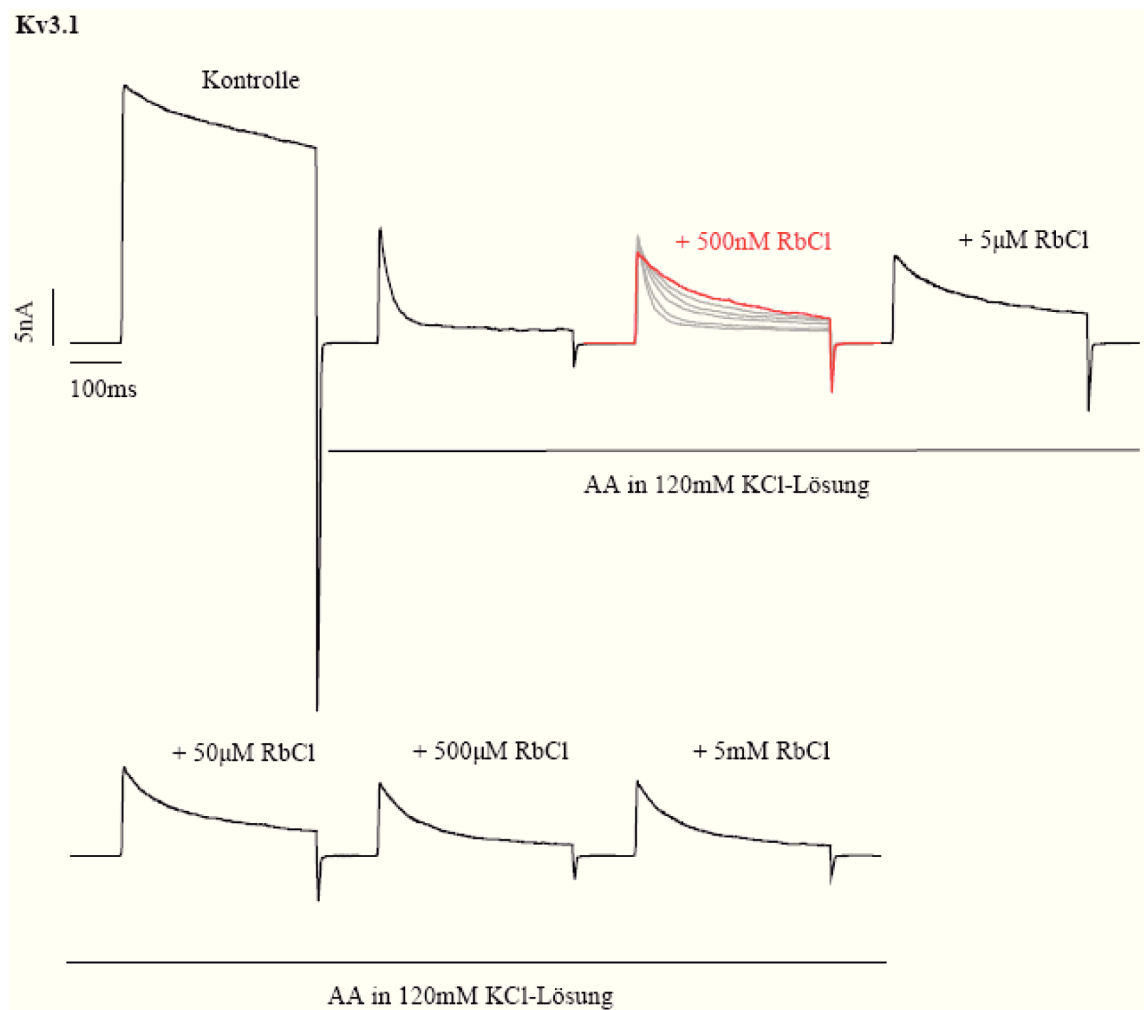
Die Pipettenlösung enthält 180mM KCl/RbCl-Lösung und die intrazelluläre Lösung 30mM KCl, welcher 10 $\mu$ M AA zugesetzt wurden. **A** Nach Depolarisation von -80mV auf +80mV werden die Kv3.1-Kanäle inaktiviert, wobei der Auswärtsstrom von Kaliumionen getragen wird. Eine Repolarisation auf -20mV bedingt einen **B** Kalium- bzw. Rubidium getragenen Einwärtsstrom.

#### 4.5.2 Rubidiumtitration der PUFA-Inaktivierung

In diesem Abschnitt soll die Rubidiumkonzentration ermittelt werden, welche benötigt wird, um die durch Arachidonsäure induzierte Inhibition des Kv3.1- (Abb.4.13) bzw. Shaker-Kanals (nicht dargestellt) abzuschwächen. Dafür wurden in eine 120mM KCl-Lösung unterschiedliche Konzentrationen von RbCl-Lösung titriert. Nach vollständiger

Inhibition der Kv3.1-Kanäle durch  $10\mu\text{M}$  AA in einer rubidiumfreien  $120\text{mM}$  KCl-Lösung wurden aufsteigend unterschiedliche Rubidiumionen-Konzentrationen ( $500\text{nM}$ ,  $5\mu\text{M}$ ,  $50\mu\text{M}$ ,  $500\mu\text{M}$  und  $5\text{mM}$  RbCl-Lösung) appliziert. Es war verblüffend zu sehen, dass in Anwesenheit von  $10\mu\text{M}$  AA  $500\text{nM}$  RbCl-Lösung ausreichten, um die Inhibition dramatisch zu verlangsamen. Bei einer Durchflussrate von  $6 \times 10^6$  Ionen pro Sekunde würde das bedeuten, dass lediglich ca. 25 Rubidiumionen pro Sekunde den Selektivitätsfilter passieren müssen, um diesen nachhaltig zu stabilisieren. Die Abschwächung der Inaktivierung erfolgte ähnlich dem Einwasch von AA und erreichte seine maximale Wirkung nach etwa 30s. Nach Applikation höherer RbCl-Konzentrationen ( $5\mu\text{M}$ - $5\text{mM}$ ) konnte die Inhibition nicht weiter abgeschwächt werden.

Die Abschwächung der AA-Inaktivierung durch niedrige Rubidiumkonzentrationen ( $5\mu\text{M}$ - $5\text{mM}$ ) war generell sehr variabel und konnte häufig bei vollständigen AA-Inaktivierungen der Kv-Kanäle nicht beobachtet werden. Erst bei sehr hohen kaliumfreien Rubidiumkonzentrationen ( $120\text{mM}$  RbCl-Lösung) wurde die Inaktivierung durch AA unabhängig von der AA-Konzentration verlangsamt (Abb.4.10). Diese Phänomene bzw. Zusammenhänge wurden allerdings nicht weiter untersucht.



**Abbildung 4.13: Rubidiumtitration der Arachidonsäure-Inaktivierung am Kv3.1-Kanal.**

In eine 120mM intrazelluläre KCl-Lösung wurden in stetiger Anwesenheit von  $10\mu\text{M}$  AA unterschiedliche Konzentrationen RbCl-Lösung hinzugegeben. Die Abschwächung der Inhibition erfolgte bereits bei einer Konzentration von 500nM RbCl-Lösung intrazellulär schrittweise nach repetitiver Aktivierung der Kv3.1-Kanäle und konnte durch die Zugabe höherer Konzentrationen RbCl-Lösung ( $5\mu\text{M}$ -5mM) nicht mehr verstärkt werden.



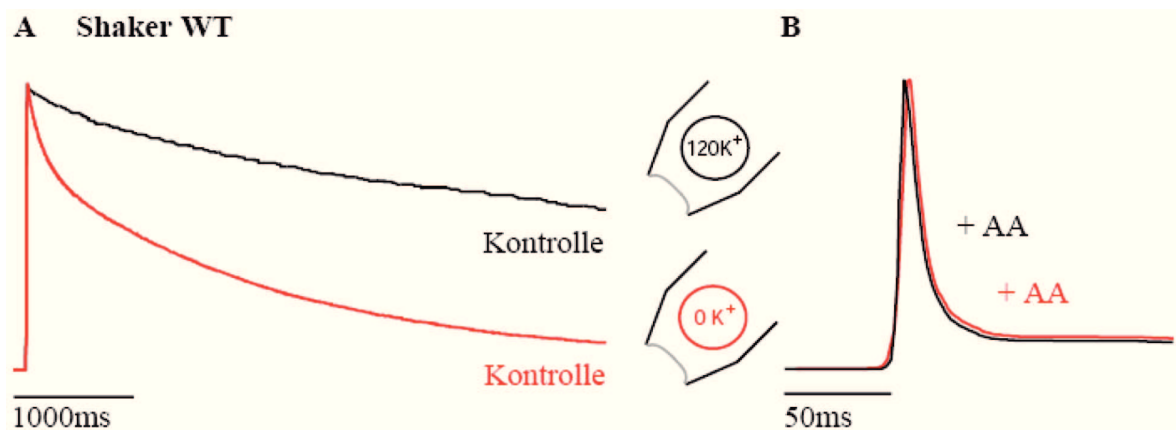
## **4.6 Vergleich der PUFA- und „C-type“**

### **Inaktivierung**

#### **4.6.1 Extrazelluläre Kaliumionen und TEA haben keinen Einfluss auf die PUFA-Inaktivierung**

In der Literatur ist seit langem beschrieben, dass sowohl hohe Konzentrationen extrazellulären Kaliums (Hoshi et al., 1990; Lopez-Barneo et al., 1993) als auch extrazellulären TEAs die „C-type“ Inaktivierung der Shaker-Kanäle abschwächt (Grissmer and Cahalan, 1989; Choi et al., 1991; Molina et al., 1997).

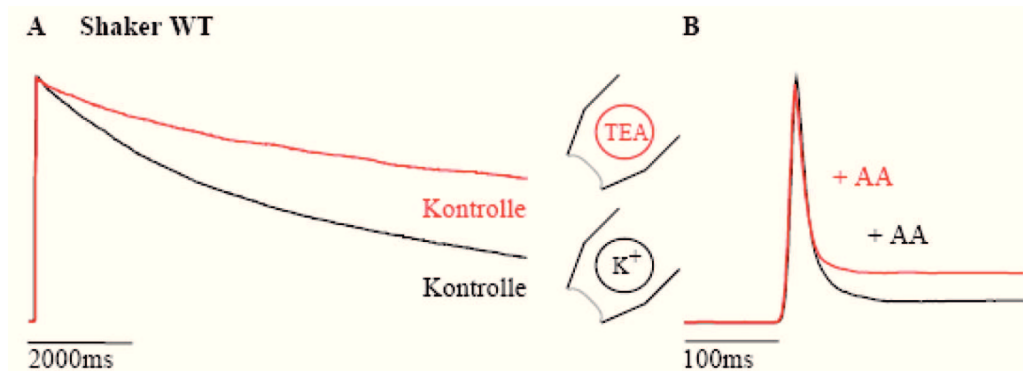
In Abbildung 4.14A ist die „C-type“ Inaktivierung von Shaker-Kanälen mit extrazellulär 0mM Kaliumlösung und 120mM Kaliumlösung nach Depolarisation der Membran auf +40mV über 5s dargestellt. Es wird ersichtlich, dass die Shakerkanäle mit 120mM Kaliumlösung deutlich langsamer inaktivieren. Nun soll getestet werden, ob auch die PUFA-Inaktivierung durch eine extrazelluläre kaliumfreien Lösung beeinflusst werden kann. Nach Applikation von 50 $\mu$ M AA erfolgte die Inhibition der Shaker-Kanäle sowohl bei 120mM Kaliumlösung ( $\tau=6,5\text{ms}$ ) als auch 0mM Kaliumlösung ( $\tau=7\text{ms}$ ) gleich schnell und vollständig ( $n=3$ ) (Abb.4.14B). Die extrazelluläre Kaliumkonzentration hat somit keinen Einfluss auf die PUFA-Inaktivierung.



**Abbildung 4.14: Beeinflussbarkeit der PUFA-Inaktivierung am Shaker-Kanal in einer kaliumfreien extrazellulären Lösung.**

**A** „C-type“-Inaktivierung und **B** PUFA-Inaktivierung der Shaker-Kanäle bei 0mM K<sup>+</sup> und 120mM K<sup>+</sup> in der Pipettenlösung. Die Verlangsamung der „C-type“ Inaktivierung bei einer hohen extrazellulären Kaliumionenkonzentration ist deutlich erkennbar. Die PUFA-Inaktivierung hingegen ist schnell und vollständig. Zur Aktivierung der Kanäle erfolgte ein Spannungssprung (**A** 5s und **B** 400ms) von -80mV auf +40mV bei intrazellulären Kaliumverhältnissen von 120mM KCl-Lösung.

In folgendem Teilabschnitt soll untersucht werden, ob extrazelluläres TEA die PUFA-Inaktivierung beeinflusst. Für diese Experimente wurde eine 120mM KCl-Lösung als Pipettenlösung jeweils mit und ohne 60mM TEA verwendet. Um die partielle Blockade der Shaker-Kanäle prozentual abzuschätzen, wurden jeweils 2 Messungen in Anwesenheit- und Abwesenheit von 60mM TEA in der Pipettenlösung pro Oocyte durchgeführt. Nach Abgleich der Messungen an mehreren Oocyten (n=4) konnten durch 60mM extrazelluläres TEA durchschnittlich 48,2% +/- 6,5% der Shaker-Kanäle in einem „inside-out“ Patch blockiert werden (MacKinnon and Yellen, 1990). In Abbildung 4.15 sind die durch extrazelluläres TEA partiell blockierten Auswärtströme auf die Stromgröße in Abwesenheit des Blockers normalisiert. Nach Applikation von 30μM AA betrug das tau 12ms +/- 4,3ms. In Anwesenheit von 60mM TEA und AA veränderte sich das tau nicht (tau=11ms +/- 0,8ms). Extrazelluläres TEA hat somit keinen Einfluss auf die PUFA- Inaktivierung.

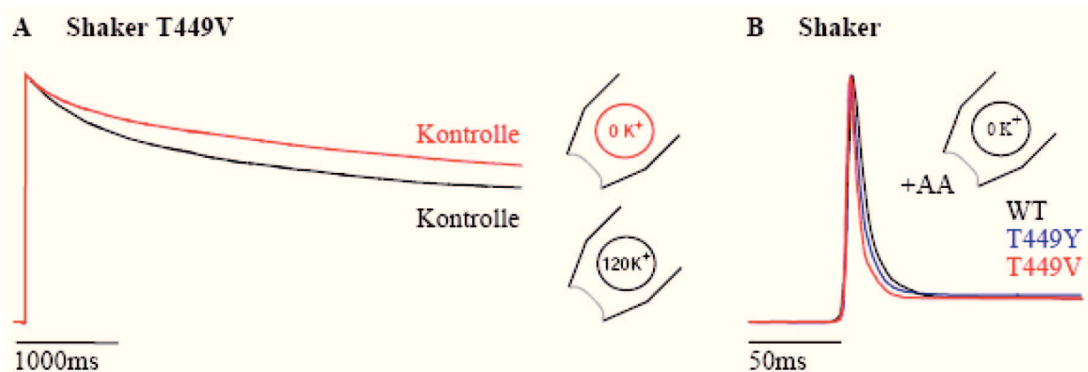


**Abbildung 4.15: Wirkung extrazellulären TEAs auf die PUFA-Inaktivierung am Shaker-Kanal.**

**A** Abschwächung der endogenen Inaktivierung der Shakerkanäle durch 60mM extrazelluläres TEA. **B** Inaktivierung der Shaker-Kanäle mit 30μM AA in Anwesenheit (tau=10ms) und Abwesenheit (tau=9ms) von 60mM extrazellulären TEAs. Eine Verlangsamung der PUFA-Inaktivierung nach TEA-Applikation ist nicht erkennbar. Die durch extrazelluläres TEA partiell blockierten Auswärtsströme wurden auf die Stromgröße in Abwesenheit des Blockers normalisiert. Zur Aktivierung der Kanäle erfolgte ein Spannungssprung von -80mV auf +40mV bei symmetrischen Kaliumverhältnissen mit 120mM KCl-Lösung.

#### 4.6.2 Mutation T449Y/V am Shaker-Kanal hat keinen Einfluss auf die PUFA-Inaktivierung

Im Rahmen der „C-type“ Inaktivierung kommt es vor allem am Shaker-Kanal zu Konformationsänderungen am Selektivitätsfilter und im Bereich der extrazellulären Pore. Die Inaktivierungskinetik der „C-type“ Inaktivierung kann durch Punktmutationen des Threonin an der Stelle 449 in der extrazellulären Porenregion im Shaker-Kanal verändert werden (López-Barneo et al., 1993). Durch das Einführen der Aminosäure Valin (Abb.4.16A) oder Tyrosin an genannter Stelle wird die „C-type“ Inaktivierung nahezu vollständig verhindert. Die PUFA-Inaktivierung ( $50\mu\text{M}$  AA) des Wildtyps ( $\tau=8,5\text{ms}$ ) und der Mutanten T449V ( $\tau=7\text{ms}$ ) und T449Y ( $\tau=7,5\text{ms}$ ) erfolgt hingegen in einer kaliumfreien Pipettenlösung gleichermaßen schnell ( $n=2$ ) (Abb.4.16B). Diese Ergebnisse implizieren, dass die „C-type“ Inaktivierung und die PUFA-Inaktivierung unterschiedliche Inaktivierungsmechanismen in der Porenregion von Kv-Kanälen darstellen.



**Abbildung 4.16: PUFA-Inaktivierung nach den Punktmutationen T449V/Y in der extrazellulären Porenregion des Shaker-Kanals.**

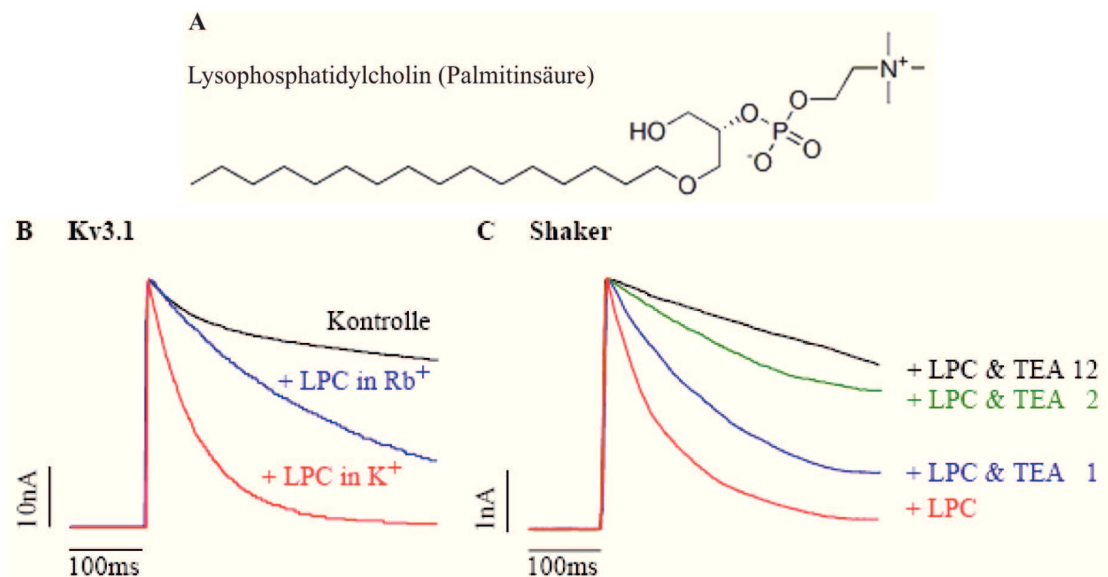
**A** Starke Verlangsamung der „C-type“ Inaktivierung bei  $0\text{mM K}^+$  in der Pipettenlösung am T449V des Shaker-Kanals. **B** PUFA-Inaktivierung des WT und der T449V bzw. T449Y bei  $0\text{mM}$  extrazellulären Kaliums im Vergleich. Die Inhibierung ist gleichermaßen potent. Zur Aktivierung der Kanäle erfolgte ein Spannungssprung (**A** 5s und **B** 400ms) von  $-80\text{mV}$  auf  $+40\text{mV}$  bei intrazellulären Kaliumverhältnissen von  $120\text{mM KCl}$ -Lösung.

## 4.7 Vielzahl von hydrophoben Substanzen induzieren eine rubidiumabhängige Inaktivierung

In diesem Abschnitt sollen unterschiedliche hydrophobe Substanzen vorgestellt werden, welche der Arachidonsäure strukturell mehr oder weniger ähneln und ebenfalls eine rubidiumabhängige Inhibition des Kv3.1-Kanals induzieren.

Zu Beginn sollen die Lysophospholipide und deren Wirkung auf den Kv3.1- und Shaker-Kanal untersucht werden. Die Lysophospholipide u.a. Lysophosphatidylcholin (LPC)- und inositol (LPI) werden durch die Aktivität der Phospholipase A2, welche die Phospholipide an der zweiten Glyzerinesterbindung spaltet, aus der Lipiddoppelmembran neben der Arachidonsäure freigesetzt. In den Experimenten wurde LPC und LPI verwendet, welches vorwiegend aus gesättigten Fettsäuren wie Stearin- und Palmitinsäure sowie zu einem kleinen Teil aus Ölsäure bestand. Um die verwendeten Substanzen in Lösung bringen zu können musste Chloroform verwendet werden, welches jedoch selbst Kaliumkanäle (Correa, 1998) beeinflussen kann. Daher wurde vor jeder Applikation der Lysophospholipide Chloroform eingewaschen und somit die Wirkung beider differenzieren zu können. LPC (Abb.17A+B) und LPI (nicht dargestellt) inaktivierten die Kv3.1-Kanäle nach Applikation von jeweils  $20\mu\text{M}$ . Eine Rubidiumabhängigkeit war bei beiden Substanzen zu beobachten.

Auch Shaker-Kanäle zeigen nach Applikation von  $30\mu\text{M}$  LPC eine deutliche Inaktivierung. Abbildung 17C zeigt die LPC-induzierte Inaktivierung nach Inhibition durch unterschiedliche intrazelluläre TEA-Konzentrationen (1, 2 und 12mM). Ähnlich der AA-Inaktivierung führt die TEA-Inhibition konzentrationsabhängig zu einer Verlangsamung der durch LPC-induzierten Inaktivierung.



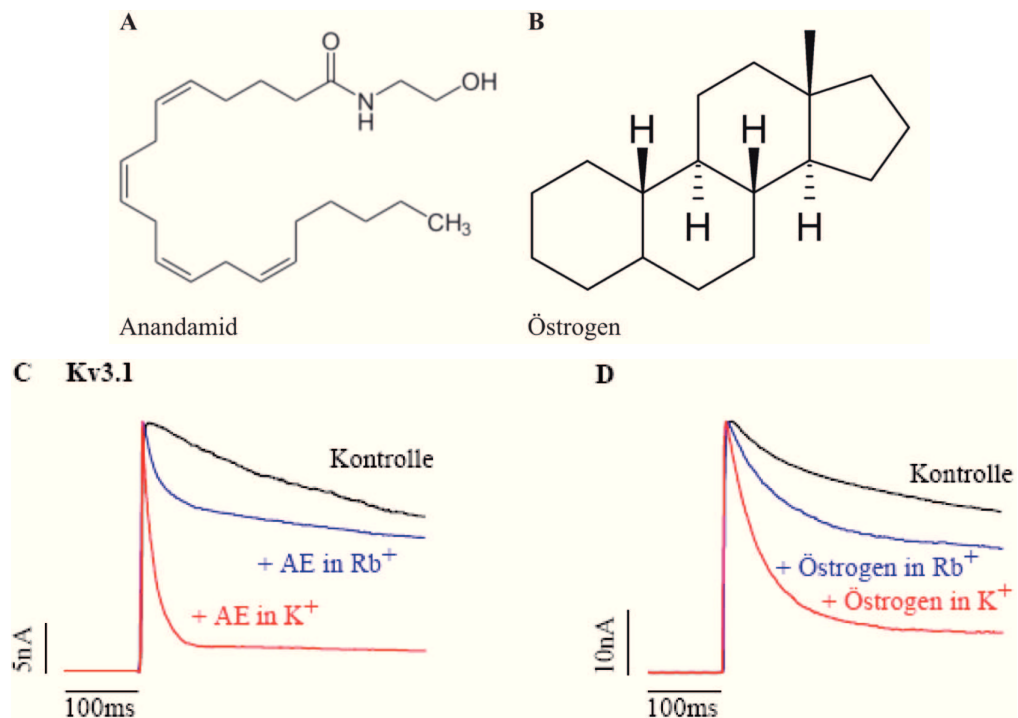
**Abbildung 4.17: Beeinflussbarkeit der LPC-Inaktivierung durch Rubidium und intrazelluläres TEA am Kv3.1- bzw. Shaker-Kanal.**

**A** Strukturformel des Lysophosphatidylcholin (LPC). **B** Inaktivierung des Kv3.1-Kanals mit 20 µM LPC. In Anwesenheit von intrazellulären Rubidiumionen ist diese deutlich verlangsamt. **C** Abschwächung der durch 30 µM LPC-induzierten Inaktivierung der Shakerkanäle in Abhängigkeit der durch TEA-blockierten Kanäle mit 1, 2 und 12 mM TEA nach Anpassung der Restströme an die initiale Stromgröße. Zur Aktivierung der Kanäle erfolgte ein Spannungssprung (400 ms) von -80 mV auf +40 mV bei einer extrazellulären 120 mM KCl-Lösung.

Im Weiteren wurden der Arachidonsäure strukturell ähnliche PUFA untersucht. Das Arachidonoyl-CoA (nicht dargestellt) und das Anandamid (Ethanolamin der Arachidonsäure) (Abb. 4.18A+C) (Oliver et al., 2004) inaktivierten den Kalium getragenen Auswärtsstrom der Kv3.1-Kanäle nach Applikation von jeweils 20 µM schnell und vollständig. Die Experimente mittels 120 mM intrazellulärer RbCl-Lösung zeigten eine starke Abschwächung der PUFA-Inaktivierung.

Zum Ende wurde die Wirkung der Steroide Östrogen (Abb. 4.18B+D), ein Sexualhormon, und Genistein (nicht dargestellt), aus der Gruppe der Isoflavone und ein Inhibitor von Tyrosinkinasen und Topoisomerasen II, auf den Kv3.1-Kanal untersucht. Beide Substanzen sind in der Literatur bereits als Kv-Kanalinhibitor (u.a. Kv1.3- und Kv2.1-Kanal) beschrieben worden (Zhang et al., 2004; Teisseyre and Michalak, 2005). Obwohl sich beide Substanzen strukturell grundlegend von den Fettsäuren unterscheiden genügen erstaunlicherweise in den durchgeführten Experimenten am Kv3.1-Kanal jeweils

20  $\mu$ M um die Kanäle zu inaktivieren. Im Vergleich zur PUFA-Inaktivierung fällt diese jedoch weniger potent aus. Eine Abschwächung der Inhibition nach Austausch der intrazellulären Kaliumionen gegen Rubidiumionen wird auch bei diesen Substanzen deutlich.



**Abbildung 4.18: Rubidiumabhängigkeit verschiedener Substanzen am Kv3.1-Kanal.**

Strukturformeln der untersuchten Substanzen **A** Anandamid und **B** Östrogen. Beide Substanzen inaktivieren den Kv3.1-Kanal nach Applikation von jeweils 20  $\mu$ M in einer 120mM KCl-Lösung intrazellulär. Das **C** Anandamid inhibiert die Kanäle im Vergleich zum **D** Östrogen potenter. Nach Wechsel des Barrels in eine 120mM RbCl-Lösung verlangsamt sich die Inaktivierung innerhalb eines Impulses von 600ms dramatisch. Die Messungen wurden an jeweils einem Patch durchgeführt. Zur Aktivierung der Kanäle erfolgte ein Spannungssprung (400ms) von -80mV auf +40mV bei einer extrazellulären 120mM KCl-Lösung.

Allen getesteten Substanzen gemein ist lediglich die Hydrophobie bei chemisch teilweise grundlegend verschiedener Struktur. Trotzdem inaktivieren alle Kv3.1- und/oder Shaker-Kanäle. Die Inaktivierung ist rubidiumabhängig und wird durch TEA abgeschwächt. Vermutlich genügt eine hydrophobe Struktur der Substanzen, um in die Kavität einzudringen und dort unspezifische Interaktionen mit den Aminosäuren im

Bereich der S6-Segmente einzugehen, welche über einen allosterischen Mechanismus an der Pore zum Schließen des Kanals führen. Genaue Angaben über Aufbau und Eigenschaften, die die Substanzen aufweisen müssen, um in Kv-Kanälen eine rubidiumabhängige Inaktivierung auszulösen, können derzeit jedoch noch nicht gemacht werden.



## 5 Diskussion

In dieser Arbeit sind zwei hypothetische Wirkmechanismen der durch PUFA-induzierten Inhibition spannungsabhängiger Kaliumkanäle (Shaker- Kv.2.1- und Kv3.1-Kanal) untersucht worden. In zwei Arbeiten wurde kürzlich vorgeschlagen, dass PUFA direkt in der Pore binden und diese dadurch blockieren (Decher et al., 2010; Moreno-Galindo et al., 2010). Dies steht im Widerspruch zu dem von Oliver et al., 2004 postulierten Wirkmechanismus, welcher von einem PUFA-induzierten Inaktivierungsmechanismus im Bereich des Selektivitätsfilters ausgeht.

### 5.1 Neues Konzept des Wirkmechanismus der PUFA-Inaktivierung

Meine Ergebnisse zeigen, dass PUFA von der intrazellulären Seite wirken. Für diese Experimente verwendete ich das AA-CoA, welches im Gegensatz zur AA die Membran nicht permeieren kann. AA-CoA inaktivierte die Kv3.1-Kanäle nur nach intrazellulärer und nicht nach extrazellulärer Applikation. AA ist membranpermeabel und induzierte daher von beiden Seiten eine Inaktivierung der Kv-Kanäle (Oliver et al., 2004).

Desweiteren führen PUFA, ähnlich wie „open-channel“ Blocker (Armstrong, 1971), zu einer Verlangsamung der Deaktivierungsrate. Vermutlich binden PUFA in der Pore und verhindern somit den Verschluss des „activation gates“, was zunächst eine „open-channel“ Blockade durch PUFA impliziert. Dieses Phänomen wird in der Literatur als „foot in the door“ Phänomen bezeichnet.

Zudem konnte ich zeigen, dass die PUFA-Inaktivierung durch intrazelluläres TEA an Shaker- und Kv2.1-Kanälen aufgehoben wird. Dieses Ergebnis ist in der Publikation von

Nils Decher (Decher et al., 2010) eingegangen bei der ich Koautor bin. Auf die PUFA-Inaktivierung von Kv3.1-Kanälen hat TEA, wie Oliver et al., 2004 bereits publizierten, hingegen keinen Einfluss. Diese Ergebnisse konnte ich bestätigen (in der Arbeit nicht dargestellt). Eine mögliche Erklärung ist die differierende Aminosäurefolge im Selektivitätsfilter (TXGYG). Anstelle des Valins in der Pore des Shaker- und Kv2.1-Kanals (TVGYG) befindet sich im Kv3.1-Kanal die Aminosäure Leucin (TLGYG). Dieser Austausch setzt vermutlich die TEA-Empfindlichkeit der Kv3.1-Kanäle so herab, dass es die PUFA-Inaktivierung nicht mehr abschwächen kann.

Der Antagonismus von TEA- und PUFA-Inhibition der Shaker- und Kv2.1-Kanäle könnte bedeuten, dass TEA und PUFA um eine gemeinsame Bindungsstelle in der Pore kompetitieren. Diese Ansicht teile ich mittlerweile nicht mehr.

Meine Untersuchungen über die Wirkung verschiedener TEA-Derivate auf die PUFA-Inaktivierung unterstützen einen anderen Mechanismus. So konnte ich zeigen, dass längerkettige TEA-Derivate u.a. Butyl- und Hexyltriethylammonium (C4- und C6-TEA) nahezu keine Wirkung auf die Geschwindigkeit der PUFA-Inaktivierung haben, obwohl sie mit höherer Affinität als TEA in der Pore binden. Dieser Unterschied zwischen z.B. TEA und C4-TEA wird verständlich, wenn man annimmt, dass PUFA die Permeation nicht blockieren, sondern einen Inaktivierungsmechanismus am Selektivitätsfilter auslösen, wie dies von Oliver et al., 2004 postuliert wird.

Es ist zudem bekannt, dass TEA durch Interaktionen mit dem Selektivitätsfilter die „C-type“ Inaktivierung verlangsamt (Baukrowitz and Yellen, 1996). C4-TEA hat hingegen keine Wirkung auf die „C-type“ Inaktivierung, weil die hydrophobe Butylkette die Kopfgruppe vom Selektivitätsfilter wegzieht.

Auch Experimente mit der Punktmutante T441S des Shaker-Kanals zeigen, dass TEA bei ca. 10fach verringerter Affinität der Kopfgruppe keinerlei Wirkung mehr auf die „C-type“ (Baukrowitz and Yellen, 1996)- und PUFA-Inaktivierung hat.

Die Analogie der Wirkung von verschiedenen TEA-Derivaten (nicht nur vom C4-TEA) auf die „C-type“ Inaktivierung und PUFA-Inaktivierung ist im Abschnitt 1 bzw. 4 ausführlich dargestellt. Dies impliziert, dass TEA nicht mit PUFA um eine Bindungsstelle kompetiert. Eine „open-channel“ Blockade durch PUFA scheint damit unwahrscheinlich. Vermutlich lösen PUFA einen Inaktivierungsmechanismus am Selektivitätsfilter aus.

Diese Annahme unterstreicht das Konzept von Oliver et al., 2004, welches im Wesentlichen auf der Wirkung von Rubidiumionen (und anderen Ionen) auf die PUFA-Inaktivierung basiert. Die Permeation von Rubidiumionen führt nämlich zu einer dramatischen Abnahme der PUFA-Inaktivierung. Ursächlich ist am ehesten eine Stabilisierung des Selektivitätsfilters durch Rubidiumionen. Die Wirkung von Rubidiumionen habe ich ebenfalls auf die AA-Inaktivierung untersucht. Ich konnte zeigen, dass alle untersuchten Kv-Kanäle (Shaker-, Kv2.1- und Kv3.1-Kanal) mit Rubidiumionen im Selektivitätsfilter kaum noch auf AA reagieren. Die dafür benötigte Rubidiumkonzentration in einer 120mM KCl-Lösung beträgt erstaunlicherweise nur 500nM (RbCl-Lösung). D.h. bei einer Durchflussrate eines Kv-Kanals von etwa  $6 \times 10^6$  pro Sekunde passieren rechnerisch ca. 25 Rubidiumionen pro Sekunde den Selektivitätsfilter. Oder anders ausgedrückt: Die Verweildauer pro Ion im Selektivitätsfilter beträgt 0,0001ms. Binnen einer Sekunde wird der Kv-Kanal also lediglich alle 40ms von einem Rubidiumion durchströmt. Innerhalb dieses Zeitabschnittes passieren allerdings ca. 240.000 Kaliumionen den Selektivitätsfilter. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wäre, dass ein Rubidiumion die Struktur des Selektivitätsfilters nachhaltig verändert und diesen somit stabilisiert. Diese Annahme ist jedoch rein spekulativ.

Desweiteren habe ich die Konzentrationsabhängigkeit der AA-Inaktivierung der genannten Kv-Kanäle untersucht und konnte bestätigen, dass die Kv3.1-Kanäle bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen AA (200nM-1 $\mu$ M AA) nahezu vollständig inaktivieren (Oliver et al., 2004). Die Shaker- und Kv2.1-Kanäle hingegen bedürfen Konzentrationen von ca. 50 $\mu$ M AA, um ähnlich potent inaktivierend zu wirken. Eine Erklärung hierfür kann derzeit nicht erfolgen. Im Rahmen weiterer Arbeiten besteht die Möglichkeit durch Sequenzvergleiche und Mutagenese, die Aminosäuren zu identifizieren, welche für die Empfindlichkeitsunterschiede verantwortlich sind.

Zudem habe ich die Wirkung von Rubidiumionen auf „klassische“ „open-channel“ Blocker (C10-TEA und AVEO118) untersucht. Ich konnte zeigen, dass die Permeation von Rubidiumionen keinen Einfluss auf die Wirkung von „open-channel“ Blockern hat, wodurch das Konzept von Oliver et al., 2004 zusätzlich unterstützt wird.

Meine Ergebnisse implizieren ein neuartiges Konzept der PUFA-Inaktivierung. Die Lokalisation der Bindungsstelle von PUFA in der Kavität unterhalb des Selektivitätsfilters ist sehr gut durch Mutagenesedaten unterlegt (Decher et al., 2010). So konnte

Decher et al., 2010 zeigen, dass Mutationen von hydrophoben Aminosäuren, die die Porenkavität auskleiden, die AA-Empfindlichkeit abschwächen. Punktmutationen der Pore abgewandten Aminosäurereste hingegen verhinderten die PUFA-Inaktivierung nicht.

Wir müssen daher davon ausgehen, dass PUFA in der Kavität unterhalb des Selektivitätsfilters binden. Die Rubidiumabhängigkeit und die Wirkung von intrazellulärem TEA implizieren jedoch, dass PUFA die Permeation nicht blockieren, sondern vermutlich mit der Porenwand interagieren und dabei den Permeationsweg freihalten. Durch Interaktionen mit den Aminosäuren unterhalb des Selektivitätsfilters (am terminalen S6-Segment) induzieren sie dann eine Destabilisierung des Selektivitätsfilters, wodurch die Permeation unterbrochen wird. Dieses Konzept, dass hydrophobe Substanzen (PUFA) in die Pore eindringen, diese aber nicht blockieren, sondern einen allosterischen Inaktivierungsmechanismus induzieren, ist neuartig.

Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte ich daher verschiedenste hydrophobe Substanzen, welche alle einen rubidiumabhängigen allosterischen Inaktivierungsmechanismus in Kv-Kanälen induzierten. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Kv-Kanal inaktivierenden Wirkung vom Lysophosphatidylcholin- und inositol, welche neben der Arachidonsäure Hydrolyseprodukte der Phospholipase A2 sind und daher von (patho)physiologischer Bedeutung sein könnten. Mit anderen Worten: Die Hydrolyseprodukte der PLA2, d.h. die AA und das LPC induzieren eine Inaktivierung in Kv-Kanälen. Der Anteil der Einzelkomponenten auf die Gesamtwirkung der Kv-Kanäle ist gegenwärtig nicht bekannt und bedarf weiterer Forschung.

## **5.2 Vergleich „C-type“ Inaktivierung und PUFA-Inaktivierung**

Die „C-type“- und PUFA-Inaktivierung führen beide zum Kollaps der Pore und somit zur Unterbrechung der Ionenpermeation und sollen daher im folgenden Abschnitt miteinander verglichen werden.

Sowohl die „C-type“ Inaktivierung (Baukrowitz and Yellen, 1996) als auch die PUFA-Inaktivierung werden stark durch intrazelluläres TEA abgeschwächt. Wie bereits erläu-

tert, stabilisiert TEA durch Interaktion mit der Aminosäure T441 des Shaker-Kanals den Selektivitätsfilter. Die Wirkung langkettiger TEA-Derivate, deren Alkylketten zunehmend stärker mit den S6-Segmenten interagieren, ist bei beiden Inaktivierungsmechanismen aufgehoben. Auch nach der Punktmutation T441S am Shaker-Kanal konnte weder die „C-type“ Inaktivierung noch die PUFA-Inaktivierung durch TEA beeinflusst werden.

Dem entgegen stehen verschiedene Unterschiede beider Inaktivierungsmechanismen. Die „C-type“ Inaktivierung wird beispielsweise durch hohe Konzentrationen extrazellulären Kaliums (Hoshi et al., 1990; Lopez-Barneo et al., 1993) abgeschwächt.

Die PUFA-Inaktivierung hingegen kann durch die Ionenzusammensetzung zum Beispiel extrazelluläre Kaliumkonzentration nicht beeinflusst werden.

Entscheidend ist die Stromrichtung und somit das Ion, welches sich gerade im Selektivitätsfilter befindet. Kationen wie das Rubidium ( $1.48\text{\AA}$ ) und Cäsium ( $1.69\text{\AA}$ ) mit größeren Atomradien und demzufolge differierenden Verteilungswahrscheinlichkeiten an den Ionenbindungsstellen im Selektivitätsfilter als Kalium ( $1.33\text{\AA}$ ) und Thallium ( $1.4\text{\AA}$ ) schwächen die PUFA-Inaktivierung der Kv-Kanäle deutlich ab (Oliver et al., 2004). Mit Hilfe der Kristallstruktur des KcsA-Kanals konnte die relative Verteilung der genannten Ionen im Selektivitätsfilter mit der Sequenz TVGYG bestimmt werden. Durchschnittlich sind 2 der 4 Ionenbindungsstellen zu einem bestimmten Zeitpunkt besetzt. Folgende Konfigurationen sind möglich: Kaliumion-Wasser-Kaliumion-Wasser (1-3 Konfiguration) und Wasser-Kaliumion-Wasser-Kaliumion (2-4 Konfiguration). Daraus ergibt sich eine Wahrscheinlichkeit von 50%, dass eine Bindungsstelle von einem Kaliumion besetzt wird. Diese Konfigurationen stabilisieren den Filter und erhalten ein Ladungsgleichgewicht. Kalium- und Thalliumionen verteilen sich relativ gleichmäßig über die 4 Bindungsstellen im Selektivitätsfilter. Rubidium- und Cäsiumionen belegen aufgrund ihres größeren Atomradius nur 3 Bindungsstellen mit höherer Wahrscheinlichkeit (Position 1, 3 und 4) (Zhou and MacKinnon, 2003). Dies hat zum einen Einfluss auf die Durchflussraten und zeigt zum anderen, dass Rubidium- und Cäsiumionen im Vergleich zu Kaliumionen auf unterschiedliche Art und Weise mit dem Selektivitätsfilter interagieren, was sich rein hypothetisch auf die PUFA-Inaktivierung auswirken kann. Atomare Details sind bisher jedoch unklar.

Diese starke Ionenabhängigkeit konnte bei der „C-type“ Inaktivierung nicht beobachtet

werden. Unveröffentlichte Daten von T. Baukrowitz zeigen, dass die „C-type“ Inaktivierung durch Rubidiumionen nicht aufgehoben werden kann.

Zudem ist bekannt, dass extrazelluläres TEA die „C-type“ Inaktivierung (Grissmer and Cahalan, 1989; Choi et al., 1991; Molina et al., 1997) abschwächt.

Auf die PUFA-Inaktivierung hat extrazelluläres TEA anhand meiner Ergebnisse jedoch keinen Einfluss.

Im Weiteren sind Aminosäuren im äußeren Bereich der Pore identifiziert worden, welche die Inaktivierungskinetik der „C-type“ Inaktivierung maßgeblich beeinflussen (Lopez-Barneo et al., 1993). Die Inaktivierungsrate kann u.a. durch das Einführen von Arginin, Lysin, Glutamat oder Alanin an der Stelle T449 des Shaker-Kanals beschleunigt und durch Valin oder Tyrosin entsprechend verlangsamt werden. Im Rahmen der „C-type“ Inaktivierung kommt es also zu strukturellen Veränderungen im extrazellulären Bereich der Pore.

Ich konnte zeigen, dass die PUFA-Inaktivierung durch Punktmutationen im extrazellulären Bereich der Pore nicht beeinflusst werden kann. Die Wirkung von PUFA auf die Mutanten T449V- sowie T449Y des Shaker-Kanals bei 0mM K<sup>+</sup> extrazellulär war gleichermaßen potent wie bei Experimenten mit dem Wildtyp.

Zusammenfassend kann die Aussage getroffen werden, dass der extrazelluläre Bereich der Pore im Rahmen der PUFA-Inaktivierung wahrscheinlich nicht eingebunden ist. Vermutlich beschränkt sich die PUFA-Inaktivierung auf einen Bereich des Selektivitätsfilters. Dies wird unterstützt durch die starke Abhängigkeit der PUFA-Inaktivierung vom permeierenden Ion.

## 6 Schlussfolgerung

PUFA binden von intrazellulär in der Kavität unterhalb des Selektivitätsfilters und interagieren dort mit hydrophoben Aminosäuren im S6-Segment. Diese Interaktion induziert dabei über einen allosterischen Mechanismus eine Konformationsänderung im Selektivitätsfilter, welcher zum Porenkollaps der Kv-Kanäle führt. Die Hypothese einer „open-channel“ Blockade durch PUFA konnte experimentell nicht bestätigt werden.

Bei der „C-type“ Inaktivierung und PUFA-Inaktivierung handelt es sich um zwei verschiedene Inaktivierungsmechanismen im Bereich der Pore von Kv-Kanälen. Während bei der „C-type“ Inaktivierung der äußere Bereich der Pore eingebunden ist, induzieren PUFA wahrscheinlich eine Konformationsänderung im Bereich des Selektivitätsfilters. Details der Interaktionen der PUFA mit der Pore und deren daraus resultierende strukturelle Veränderung ist gegenwärtig unklar. Letztlich wird eine Kristallstruktur mit inkorporierten PUFA notwendig sein, um diesen Inaktivierungsmechanismus auf atomarem Niveau zu verstehen.

Viele andere hydrophobe Substanzen mit unterschiedlichster Struktur (u.a. Anandamid, LPC, Östrogen) induzieren einen rubidiumabhängigen allosterischen Inaktivierungsmechanismus der Kv-Kanäle. Der etablierte Wirkmechanismus der PUFA scheint damit nicht auf die Gruppe der mehrfach ungesättigten Fettsäuren beschränkt zu sein. Die Voraussetzungen u.a. Aufbau und Eigenschaften, die eine Substanz erfüllen muss, um einen Kv-Kanal potent zu inhibieren, bedürfen weiterer Forschung.

## 7 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Accili EA, Kiehn J, Yang Q, Wang Z, Brown AM, Wible BA. 1997. Separable Kvbeta subunit domains alter expression and gating of potassium channels. Biol Chem, 272 (41): 25824-25831.
- Aldrich RW. 2001. Fifty years of inactivation. Nature, 411 (6838): 643-644.
- Armstrong CM. 1971. Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons. J Gen Physiol, 58 (4): 413-437.
- Antz C, Bauer T, Kalbacher H, Frank R, Covarrubias M, Kalbitzer HR, et al. 1999. Control of K<sup>+</sup> channel gating by protein phosphorylation: structural switches of the inactivation gate. Nat Struct Biol, 6 (2): 146-150.
- Archer SL, Souil E, Dinh-Xuan AT, Schremmer B, Mercier JC, El Yaagoubi A, et al. 1998. Molecular identification of the role of voltage-gated K<sup>+</sup> channels, Kv1.5 and Kv2.1, in hypoxic pulmonary vasoconstriction and control of resting membrane potential in rat pulmonary artery myocytes. J Clin Invest, 101 (11): 2319-2330.
- Baukrowitz T and Yellen G. 1996. Two functionally distinct subsites for the binding of internal blockers to the pore of voltage-activated K<sup>+</sup> channels. Proc Natl Acad Sci USA, 93 (23): 13357-13361.
- Beck EJ, Sorensen RG, Slater SJ, Covarrubias M. 1998. Interactions between multiple phosphorylation sites in the inactivation particle of a K<sup>+</sup> channel. Insights into the molecular mechanism of protein kinase C action. J Gen Physiol, 112 (1): 71-84.
- Beeton C, Barbaria J, Giraud P, Devaux J, Benoliel AM, Gola M, et al. 2001. Selec-



- tive blocking of voltage-gated  $K^+$  channels improves experimental autoimmune encephalomyelitis and inhibits T cell activation. *J Immunol*, 166 (2): 936-944.
- Beeton C, Wulff H, Barbaria J, Clot-Faybesse O, Pennington M, Bernard D, et al. 2001. Selective blockade of T lymphocyte  $K^+$  channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98 (24): 13942-13947.
- Bendahhou S, Cummins TR, Agnew WS. 1997. Mechanism of modulation of the voltage-gated skeletal and cardiac muscle sodium channels by fatty acids. *Am J Physiol*, 272 (2 Pt 1): C592-600.
- Bhalla T, Rosenthal JJ, Holmgren M, Reenan R. 2004. Control of human potassium channel inactivation by editing of a small mRNA hairpin. *Nat Struct Mol Biol*, 11 (10): 950-956.
- Butler A, Wei AG, Baker K, Salkoff L. 1989. A family of putative potassium channel genes in *Drosophila*. *Science*, 243 (4893): 943-947.
- Butler A, Wei A, Salkoff L. 1990. Shal, Shab and Shaw: three genes encoding potassium channels in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res*, 18 (8): 2173-2174.
- Catterall WA. 1988. Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science*, 242 (4875): 50-61.
- Catterall WA. 1995. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu Rev Biochem*, 64: 493-531.
- Chandy KG. 1991. Simplified gene nomenclature. *Nature*, 352 (6330): 26.
- Chandy KG and Gutman GA. 1995. Voltage-gated potassium channel genes. In R.A. North (Ed.), *Handbook of receptors and channels ligand-and voltage-gated ion channels* (pp. 1-71). Boca Raton: CRC Press.
- Choi KL, Aldrich RW, Yellen G. 1991. Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated  $K^+$  channels. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88 (12): 5092-5095.
- Choi KL, Mossman C, Aube J, Yellen G. 1993. The internal quaternary ammonium receptor site of Shaker potassium channels. *Neuron*, 10 (3): 533-541.

- Christie MJ, North RA, Osborne PB, Douglass J, Adelman JP. 1990. Heteropolymeric potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes from cloned subunits. *Neuron*, 4 (3): 405-411.
- Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, et al. 1999. Molecular diversity of K<sup>+</sup> channels. *Ann N Y Acad Sci*, 868: 233-285.
- Connor JA and Stevens CF. 1971. Inward and delayed outward membrane currents in isolated neural somata under voltage clamp. *J Physiol*, 213 (1): 1-19.
- Connor JA and Stevens CF. 1971. Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in gastropod neural somata. *J Physiol*, 213 (1): 21-30.
- Correa AM. 1998. Gating kinetics of Shaker K<sup>+</sup> channels are differentially modified by general anesthetics. *Am J Physiol*, 275 (4 Pt 1): C1009-1021.
- Covarrubias M, Wei AA, Salkoff L. 1991. Shaker, Shal, Shab and Shaw express independent K<sup>+</sup> current systems. *Neuron*, 7 (5): 763-773.
- Cox RH. 2005. Molecular determinants of voltage-gated potassium currents in vascular smooth muscle. *Cell Biochem Biophys*, 42 (2): 167-195.
- Decher N, Pirard B, Bundis F, Peukert S, Baringhaus KH, Busch AE. 2004. Molecular basis for Kv1.5 channel block: conservation of drug binding sites among voltage-gated K<sup>+</sup> channels. *J Biol Chem*, 279 (1): 394-400.
- Decher N, Kumar P, Gonzalez T, Pirard B, Sanguinetti MC. 2006. Binding site of a novel Kv1.5 blocker: a „foot in the door“ against atrial fibrillation. *Mol Pharmacol*, 70 (4): 1204-1211.
- Decher N, Streit AK, Rapedius M, Netter MF, Marzian S, Ehling P, et al. 2010. RNA editing modulates the binding of drugs and highly unsaturated fatty acids to the open pore of Kv potassium channels. *EMBO J*, 29 (13): 2101-2113.
- Derst C and Karschin A. 1998. Evolutionary link between prokaryotic and eukaryotic K<sup>+</sup> channels. *J Exp Biol*, 201 (Pt 20): 2791-2799.
- Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, et al. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K conduction and selectivity. *Science*, 280 (5360): 69-77.

- Du J, Haak LL, Phillips-Tansey E, Russell JT, McBain CJ. 2000. Frequency-dependent regulation of rat hippocampal somato-dendritic excitability by the K<sup>+</sup> channel subunit Kv2.1. *J Physiol*, 522 (Pt 1): 19-31.
- Dumont JN. 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol*, 136 (2): 153-179.
- Duprat F, Lesage F, Patel AJ, Fink M, Romey G, Lazdunski M. 2000. The neuroprotective agent riluzole activates the two P domain K<sup>+</sup> channels TREK-1 and TRAAK. *Mol Pharmacol*, 57 (5): 906-912.
- Durell SR, Shrivastava IH, Guy HR. 2004. Models of the structure and voltage-gating mechanism of the Shaker K<sup>+</sup> channel. *Biophys J*, 87 (4): 2116-2130.
- Erisir A, Lau D, Rudy B, Leonard CS. 1999. Function of specific K<sup>+</sup> channels in sustained high-frequency firing of fast-spiking neocortical interneurons. *J Neurophysiol*, 82 (5): 2476-2489.
- Fink M, Duprat F, Lesage F, Reyes R, Romey G, Heurteaux C, et al. 1996. Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K<sup>+</sup> channel. *EMBO J*, 15 (24): 6854-6862.
- Frech GC, VanDongen AM, Schuster G, Brown AM, Joho RH. 1989. A novel potassium channel with delayed rectifier properties isolated from rat brain by expression cloning. *Nature*, 340 (6235): 642-645.
- Ghosh M, Tucker DE, Burchett SA, Leslie CC. 2006. Properties of the Group IV phospholipase A2 family. *Prog Lipid Res*, 45 (6): 487-510.
- Goldberg EM, Watanabe S, Chang SY, Joho RH, Huang ZJ, Leonard CS, et al. 2005. Specific functions of synaptically localized potassium channels in synaptic transmission at the neocortical GABAergic fast-spiking cell synapse. *J Neurosci*, 25 (21): 5230-5235.
- Grissmer S and Cahalan M. 1989. TEA prevents inactivation while blocking open K<sup>+</sup> channels in human T lymphocytes. *Biophys J*, 55 (1): 203-206.
- Gulbis JM, Zhou M, Mann S, MacKinnon R. 2000. Structure of the cytoplasmic beta subunit-T1 assembly of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels.

- Science, 289 (5476): 123-127.
- Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, et al. 2005. International union of pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. Pharmacol Rev, 57 (4): 473-508.
- Hanlon MR and Wallace BA. 2002. Structure and function of voltage-dependent ion channel regulatory beta subunits. Biochemistry, 41 (9): 2886-2894.
- Heinemann SH, Rettig J, Graack HR, Pongs O. 1996. Functional characterization of Kv channel beta-subunits from rat brain. J Physiol, 493 (Pt3): 625-633.
- Hervieu GJ, Cluderay JE, Gray CW, Green PJ, Ranson JL, Randall AD, et al. 2001. Distribution and expression of TREK-1, a two-pore-domain potassium channel, in the adult rat CNS. Neuroscience, 103 (4): 899-919.
- Hibbeln JR. 1998. Fish consumption and major depression. Lancet, 351 (9110): 1213.
- Hille B. 2001. Ion Channels of Excitable Membranes. Sinauer Associates, Sunderland, MA, ed. 3).
- Ho CS, Grange RW, Joho RH. 1997. Pleiotropic effects of a disrupted K<sup>+</sup> channel gene: reduced body weight, impaired motor skill and muscle contraction, but no seizures. Proc Natl Acad Sci USA, 94 (4): 1533-1538.
- Hodgkin AL, Huxley AF, Katz B. 1952. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo. J Physiol, 116 (4): 424-448.
- Hoffman DA, Magee JC, Colbert CM, Johnston D. 1997. K<sup>+</sup> channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. Nature, 387 (6636): 869-875.
- Honoré E, Barhanin J, Attali B, Lesage F, Lazdunski M. 1994. External blockade of the major cardiac delayed-rectifier K<sup>+</sup> channel (Kv1.5) by polyunsaturated fatty acids. Proc Natl Acad Sci USA, 91 (5): 1937-1941.
- Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW. 1990. Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. Science, 250 (4980): 533-538.
- Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW. 1991. Two types of inactivation in Shaker K<sup>+</sup>

- channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron*, 7 (4): 547-556.
- Huang JM, Xian H, Bacaner M. 1992. Long-chain fatty acids activate calcium channels in ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89 (14): 6452-6456.
- Isacoff EY, Jan YN, Jan LY. 1990. Evidence for the formation of heteromultimeric potassium channels in *Xenopus* oocytes. *Nature*, 345 (6275): 530-534.
- Isom LL, De Jongh KS, Catterall WA. 1994. Auxiliary subunits of voltage-gated ion channels. *Neuron*, 12 (6): 1183-1194.
- Jacobsen DA, Weber CR, Bao S, Turk J, Philipson LH. 2007. Modulation of the pancreatic islet beta-cell-delayed rectifier potassium channel Kv2.1 by the polyunsaturated fatty acid arachidonate. *J Biol Chem*, 282 (10): 7442-7449.
- Jan LY and Jan YN. 1992. Tracing the roots of ion channels. *Cell*, 69 (5): 715-718.
- Jan LY and Jan YN. 1997. Cloned potassium channels for eukaryotes and prokaryotes. *Annu Rev Neurosci*, 20: 91-123.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT, et al. 2003a. X-ray structure of a voltage- dependent  $K^+$  channel. *Nature*, 423 (6935): 33-41.
- Jiang Y, Ruta V, Chen J, Lee A, MacKinnon R. 2003b. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent  $K^+$  channel. *Nature*, 423 (6935): 42-48.
- Joho RH, Street C, Matsushita S, Knöpfel T. 2006. Behavioral motor dysfunction in Kv3-type potassium channel-deficient mice. *Genes Brain Behav*, 5 (6): 472-482.
- Kamb A, Iverson LE, Tanouye MA. 1987. Molecular characterization of Shaker, a *Drosophila* gene potassium channel. *Cell*, 50 (3): 405-413.
- Keros S and McBain CJ. 1997. Arachidonic acid inhibits transient potassium currents and broadens action potentials during electrographic seizures in hippocampal pyramidal and inhibitory interneurons. *J Neurosci*, 17 (10): 3476-3487.
- Kim D and Clapham DE. 1989. Potassium channels in cardiac cells activated by arachidonic acid and phospholipids. *Science*, 244 (4909): 1174-1176.
- Kim D, Sladek CD, Aguado-Velasco C, Mathiasen JR. 1995. Arachidonic acid activation

- of a new family of  $K^+$  channels in cultured rat neuronal cells.  
*J Physiol*, 484 ( Pt 3): 643-660.
- Kreusch A, Pfaffinger PJ, Stevens CF, Choe S. 1998. Crystal structure of the tetramerization domain of the Shaker potassium channel. *Nature*, 392 (6679): 945-948.
- Kuryshev YA, Wible BA, Gudz TI, Ramirez AN, Brown AM. 2001. KChAP/Kvbeta1.2 interactions and their effects on cardiac Kv channel expression.  
*Am J Physiol Cell Physiol*, 281 (1): C290-299.
- Lauritzen I, Blondeau N, Heurteaux C, Widmann C, Romey G, Lazdunski M. 2000. Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors.  
*EMBO J*, 19 (8): 1784-1793.
- Lesage F and Lazdunski M. 2000. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol*, 279 (5): F793-801.
- Lien CC and Jonas P. 2003. Kv3 potassium conductance is necessary and kinetically optimized for high-frequency action potential generation in hippocampal interneurons. *J Neurosci*, 23 (6): 2058-2068.
- Liman ER, Hess P, Weaver F, Koren G. 1991. Voltage-sensing residues in the S4 region of a mammalian  $K^+$  channel. *Nature*, 353 (6346): 752-756.
- Long SB, Campbell EB, MacKinnon R. 2005a. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family  $K^+$  channel. *Science*, 309 (5736): 897-903.
- Long SB, Campbell EB, MacKinnon R. 2005b. Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science*, 309 (5736): 903-908.
- López-Barneo J, Hoshi T, Heinemann SH, Aldrich RW. 1993. Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of Shaker potassium channels. *Receptor Channels*, 1 (1): 61-71.
- MacDonald PE, Ha XF, Wang J, Smukler SR, Sun AM, Gaisano HY, et al. 2001. Members of the Kv1 and Kv2 voltage-dependent  $K^+$  channel families regulate insulin secretion. *Mol Endocrinol*, 15 (8): 1423-1435.
- MacDonald PE and Wheeler MB. 2003. Voltage-dependent  $K^+$  channels in pancreatic beta cells: role, regulation and potential as therapeutic targets.

- Diabetologia, 46 (8): 1046-1062.
- MacKinnon R and Yellen G.1990. Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated  $K^+$  channels. *Science*, 250 (4978): 276-279.
- Maletic-Savatic M, Lenn NJ, Trimmer JS. 1995. Differential spatiotemporal expression of  $K^+$  channel polypeptides in rat hippocampal neurons developing in situ and in vitro. *J Neurosci*, 15 (5 Pt 2): 3840-3851.
- McCormack T and McCormack K. 1994. Shaker  $K^+$  channel beta subunits belong to an NAD(P)H- dependent oxidoreductase superfamily. *Cell*, 79 (7): 1133-1135.
- Michelakis ED, McMurtry MS, Wu XC, Dyck JR, Moudgil R, Hopkins TA, et al. 2002. Dichloroacetate, a metabolic modulator, prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats: role of increased expression and activity of voltage- gated potassium channels. *Circulation*, 105 (2): 244-250.
- Misonou H, Mohapatra DP, Trimmer JS. 2005. Kv2.1: a voltage-gated  $K^+$  channel critical to dynamic control of neuronal excitability. *Neurotoxicology*, 26 (5): 743-752.
- Molina A, Castellano AG, López-Barneo J. 1997. Pore mutations in Shaker  $K^+$  channels distinguish between the sites of tetraethylammonium blockade and C-type inactivation. *J Physiol*, 499 ( Pt 2): 361-367.
- Morales MJ, Castellino RC, Crews AL, Rasmusson RL, Strauss HC. 1995. A novel beta subunit increases rate of inactivation of specific voltage-gated potassium channel alpha subunits. *J Biol Chem*, 270 (11): 6272-6277.
- Moreno-Galindo EG, Barrio-Echavarría GF, Vásquez JC, Decher N, Sachse FB, Tristani-Firouzi M, et al. 2010. Molecular basis for a high-potency open-channel block of Kv1.5 channel by the endocannabinoid anandamide. *Mol Pharmacol*, 77 (5): 751-758.
- Murakoshi H and Trimmer JS. 1999. Identification of the Kv2.1  $K^+$  channel as a major component of the delayed rectifier  $K^+$  current in rat hippocampal neurons. *J Neurosci*, 19 (5): 1728-1735.
- Murrell-Lagnado RD and Aldrich RW. 1993a. Energetics of Shaker potassium channels

- block by inactivation peptides. *J Gen Physiol*, 102 (6): 977-1003.
- Murrell-Lagnado RD and Aldrich RW. 1993b. Interactions of amino terminal domains of Shaker potassium channels with a pore blocking site studied with synthetic peptides. *J Gen Physiol*, 102 (6): 949-975.
- Oliver D, Lien CC, Soom M, Baukrowitz T, Jonas P, Fakler B. 2004. Functional conversion between A-type and delayed rectifier K<sup>+</sup> channels by membrane lipids. *Science*, 304 (5668): 265-270.
- Papazian DM, Schwarz TL, Tempel BL, Jan YN, Jan LY. 1987. Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science*, 237 (4816): 749-753.
- Papazian DM, Timpe LC, Jan YN, Jan LY. 1991. Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature*, 349 (6307): 305-310.
- Patel AJ, Honoré E, Maingret F, Lesage F, Fink M, Duprat F, et al. 1998. A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K<sup>+</sup> channel. *EMBO J*, 17(15): 4283-4290.
- Pongs O, Kecskemethy N, Müller R, Krah-Jentgens I, Baumann A, Kiltz HH, et al., 1988. Shaker encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of *Drosophila*. *EMBO J*, 7 (4): 1087-1096.
- Pongs O. 1992. Structural basis of voltage-gated K<sup>+</sup> channel pharmacology. *Trends Pharmacol Sci*, 13 (9): 359-365.
- Ramakers GM and Storm JF. 2002. A postsynaptic transient K<sup>+</sup> current modulated by arachidonic acid regulates synaptic integration and threshold for LTP induction in hippocampal pyramidal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99 (15): 10144-10149.
- Rasmusson RL, Morales MJ, Wang S, Liu S, Campbell DL, Brahmajothi MV, et al. 1998. Inactivation of voltage-gated cardiac K<sup>+</sup> channels. *Circ Res*, 82 (7): 739-750.
- Rettig J, Wunder F, Stocker M, Lichtinghagen R, Mastiaux F, Beckh S, et al. 1992. Characterization of a Shaw-related potassium channel family in rat brain. *EMBO J*, 11 (7): 2473-2486.



- Robertson B. 1997. The real life of voltage-gated  $K^+$  channels: more than model behaviour. *Trends Pharmacol Sci*, 18 (12): 474-483.
- Ruppersberg JP, Schröter KH, Sakmann B, Stocker M, Sewing S, Pongs O. 1990. Heteromultimeric channels formed by rat brain potassium-channel proteins. *Nature*, 345 (6275): 535-537.
- Salkoff L, Baker K, Butler A, Covarrubias M, Pak MD, Wei A. 1992. An essential „set“ of  $K^+$  channels conserved in flies, mice and humans. *Trends Neurosci*, 15 (5): 161-166.
- Schmidt und Lang. 2007. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. 50te Auflage. Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- Sewing S, Roeper J, Pongs O. 1996. Kv beta 1 subunit binding specific for Shaker-related potassium channel alpha subunits. *Neuron*, 16 (2): 455-463.
- Shi G, Nakahira K, Hammond S, Rhodes KJ, Schechter LE, Trimmer JS. 1996. Beta subunits promote  $K^+$  channel surface expression through effects early in biosynthesis. *Neuron*, 16 (4): 843-852.
- Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M. 2000. Potassium channels: Molecular defects, diseases and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev*, 52 (4): 557-594.
- Shrivastava IH, Durell SR, Guy HR. 2004. A model of voltage gating developed using the KvAP channel crystal structure. *Biophys J*, 87 (4): 2255-2270.
- Six DA and Dennis EA. 2000. The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta*, 1488 (1-2): 1-19.
- Starace DM and Benzanilla F. 2004. A proton in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field. *Nature*, 427 (6974): 548-553.
- Stoll AL, Locke CA, Marangell LB, Severus WE. 1999. Omega-3 fatty acids and bipolar disorder: a review. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 60 (5-6): 329-337.
- Szekely A, Kitajka K, Panyi G, Marian T, Gaspar R, Krasznai Z. 2007. Nutrition

- and immune System: certain fatty acids differently modify membran composition and consequently Kinetics of Kv1.3 channels of human peripheral lymphocytes. *Immunobiology*, 212 (3): 213-227.
- Teisseyre A and Michalak K. 2005. Genistein inhibits the activity of kv1.3 potassium channels in human T lymphocytes. *J Membr Biol*, 205 (2): 71-79.
- Tempel BL, Papazian DM, Schwarz TL, Jan YN, Jan LY. 1987. Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*. *Science*, 237 (4816): 770-775.
- Triggiani M, Granata F, Frattini A, Marone G. 2006. Activation of human inflammatory cells by secreted phospholipases A2. *Biochim Biophys Acta*, 1761 (11): 1289-1300.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. 2001. The sequence of the human genome. *Science*, 291 (5507): 1304-1351.
- Villarroel A and Schwarz TL. 1996. Inhibition of the Kv4 (Shal) family of transient  $K^+$  currents by arachidonic acid. *J Neurosci*, 16 (8): 2522-2532.
- Vreugdenhil M, Bruehl C, Voskuyl RA, Kang JX, Leaf A, Wadman WJ. 1996. Polyunsaturated fatty acids modulate sodium and calcium currents in CA1 neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93 (22): 12559-12563.
- Wei A, Covarrubias M, Butler A, Baker K, Pak M, Salkoff L. 1990.  $K^+$  current diversity is produced by an extended gene family conserved in *Drosophila* and mouse. *Science*, 248 (4955): 599-603.
- White JA, McAlpine PJ, Antonarakis S, Cann H, Eppig JT, Frazer K, et al. 1997. Guidelines for human gene nomenclature (1997). HUGO Nomenclature Committee. *Genomics*, 45 (2): 468-471.
- Xiao Y and Li X. 1999. Polyunsaturated fatty acids modify mouse hippocampal neuronal excitability during excitotoxic or convulsant stimulation. *Brain Res*, 846 (1): 112-121.
- Yang N, George AL, JR, Horn R. 1996. Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 16 (1): 113-122.
- Yellen G, Jurman ME, Abramson T, MacKinnon R. 1991. Mutation affecting internal

- TEA blockade indentify the probable pore-forming region of a  $K^+$  channel.  
Science, 251 (4996): 939-942.
- Yellen G. 1998. The moving parts of voltage-gated ion channels.  
Q Rev Biophys, 31 (3): 239-295.
- Yellen G. 2002. The voltage-gated potassium channels and their relatives.  
Nature, 419 (6902): 35-42.
- Yu W, Xu J, Li M. 1996. NAB domain is essential for the subunit assembly of both  
alpha-alpha and alpha-beta complexes of shaker-like potassium channels.  
Neuron, 16 (2): 441-453.
- Zagotta WN, Hoshi T, Aldrich RW. 1990. Restoration of inactivation in mutants of  
Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB.  
Science, 250 (4980): 568-571.
- Zhang W, Jin HW, Zhang HX, Xu SF, Yu HB, Wang XL. 2004. Effect of 17beta-  
estradiol on Kv2.1 current and delayed rectifier potassium current in cultured rat  
hippocampal neurons. Yao Xue Xue Bao, 39 (9): 686-690. Chinese.
- Zhou M, Morais-Cabral JH, Mann S, MacKinnon R. 2001. Potassium channel receptor  
site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors.  
Nature, 411 (6838): 657-661.
- Zhou Y and MacKinnon R. 2003. The occupancy of ions in the  $K^+$  selectivity filter:  
charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change  
underlie high conduction rates. J Mol Biol, 333 (5): 965-975.

# Anhang

## Curriculum vitae

Name:	Annemarie Köhler
Geburtstag:	19.08.1983
Geburtsort:	Hildburghausen
Nationalität:	deutsch
1994-2002:	Besuch des Staatlichen Gymnasiums Bad Berka-Blankenhain, Schulteil Blankenhain
06/2002:	Abitur
10/2002:	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller- Universität, Jena
08/2004:	Vorärztliche Prüfung (Physikum)
seit 06/2006:	Promotion im Institut für Physiologie II der Friedrich-Schiller- Universität bei Prof. Dr. Baukrowitz,
10/2006-09/2007:	12-monatiges Stipendium für eine wissenschaftliche Promotionsarbeit
11/2009:	Abschluss des Humanmedizin-Studiums mit dem Zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Staatsexamen)
12/2009-09/2010:	Beginn der Ausbildung zur Fachärztin für Neurologie im Helios Klinikum Erfurt
seit 01/2011:	Fortsetzung der Facharztausbildung im Klinikum Aschaffenburg

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben.

Ich danke Professor Klaus Benndorf, dass ich in seinem Institut ungehindert meinen Forschungen nachgehen konnte.

Ich möchte mich auch rechthetlich bei den technischen Mitarbeiterinnen Birgit Tietsch, Sandra Bernhard und Andrea Kolchmeier für die hervorragenden Oocytenpräparationen bedanken.

Besonderer Dank gilt desweiteren der technischen Mitarbeiterin Sonja Rabe für die Herstellung der RNA und der Maßlösungen.

Dr. Hariolf Fritzenschaft danke ich sowohl für die RNA als auch für viele interessante Gespräche und Diskussionen im Labor.

Dr. Markus Rapedius war mir vor allem in der Anfangszeit ein unersetzlicher Berater und sehr angenehmer und aufmerksamer Kollege.

Ein weiterer guter Freund und Kollege ist mir Krishna Murali Bollepalli geworden, mit dem ich so einige lustige Stunden und Abende im Labor verbracht habe.

Mein größter Dank gilt jedoch meinem Doktorvater, Betreuer und wissenschaftlichen Mentor Professor Thomas Baukrowitz. Ohne ihn wäre das Zustandekommen dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Durch ihn wurde mein Bestreben wissenschaftlich zu Arbeiten noch bestärkt. Die Forschung wird sicher Bestandteil meines Lebens werden. Vielen, vielen Dank Thomas!

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie für die ständige Unterstützung im Hintergrund.

# Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Erstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. T. Baukrowitz, Dr. M. Rapedius, Dr. H. Fritzenschaft, K.M. Bollepalli und C. Köhler,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Aschaffenburg, September 2011

Annemarie Köhler, Verfasserin